

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюро



(43) Дата международной публикации:
27 января 2005 (27.01.2005)

РСТ

(10) Номер международной публикации:
WO 2005/007187 A1

(51) Международная патентная классификация¹:
A61K 38/43, 31/7088, 39/395, A61M 1/36, G01N 33/68,
A61P 35/00, 31/00

(74) Агент: САНДИГУРСКИЙ Олег Львович; 191040
Санкт-Петербург, а/я 40 (RU) [SANDIGURSKY,
Oleg Lvovich, St. Petersburg (RU)].

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU2003/000304

(81) Указанные государства (национально): AU, BR,
CA, CN, CU, HR, HU, IL, IN, JP, KR, RU, SK, US,
YU.

(22) Дата международной подачи:
14 июля 2003 (14.07.2003)

(84) Указанные государства (регионально) евразийский
патент (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(25) Язык подачи: русский

(26) Язык публикации: русский

(71) Заявители и

(72) Изобретатели: ТЕЦ Виктор Вениаминович
[RU/RU]; 196066 Санкт-Петербург, ул. Ленсовета,
д. 27, кв.95 (RU) [TETS, Viktor Veniaminovich,
St.Petersburg (RU)]; ГЕНКИН Дмитрий Дмитрие-
вич [RU/RU]; 197000 Санкт-Петербург, Константи-
новский пр., д. 26, кв.2 (RU) [GENKIN, Dmitry
Dmitrievich, St.Petersburg (RU)].

Опубликована

С отчетом о международном поиске.

(72) Изобретатель; и

(75) Изобретатель/Заявитель (только для (US): ТЕЦ
Георгий Викторович [RU/RU]; 191025 Санкт-
Петербург, ул. Пушкинская, д. 13, кв. 41 (RU)
[TETS, Georgy Viktorovich, St.Petersburg (RU)].

В отношении двухбуквенных кодов, кодов языков и дру-
гих сокращений см. «Пояснения к кодам и сокращениям»,
публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюл-
летеня РСТ.

(54) Title: METHOD FOR TREATING ONCOLOGICAL, VIRULENT AND SOMATIC DISEASES, METHOD FOR
CONTROLLING TREATMENT EFFICIENCY, PHARMACEUTICAL AGENTS AND COMPOSITION FOR CARRYING
OUT SAID TREATMENT

(54) Название изобретения: СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ, ИНФЕКЦИОННЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ И
КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ЛЕЧЕНИЯ

(57) Abstract: The invention relates to medicine and veterinary science and discloses a novel method for treating oncological,
virulent and somatic diseases whose main target for therapeutic action is embodied in the form of DNA which freely circulates
in blood plasma (and other liquid media) and originates from tumoral and mutant cells or cells infected by bacteria, fungi or
protozoan and from different microorganisms which reside in the organism thereof. Said invention also relates to novel
pharmaceutical compositions and to the use thereof for treating oncological diseases and infectious states provoked by bacteria,
fungi and protozoa and non-infectious somatic diseases and states produced by accumulation of somatic mutations in cells of
organism. Medicinal and immunological compositions, sorption and physico-chemical engineering and the method for using
them in order to treat malignant tumors and other diseases are also disclosed.

[Продолжение на след. странице]



WO 2005/007187 A1



(57) **Реферат:** Изобретение относится к медицине и ветеринарии и раскрывает новый способ лечения онкологических, инфекционных и неинфекционных заболеваний, при котором главной мишенью терапевтического воздействия является свободно циркулирующая в плазме крови (и других жидких средах) ДНК, происходящая из находящихся в его организме опухолевых, мутантных, или инфицированных бактериями, грибами, простейшими клеток, а также из различных микроорганизмов. Описаны новые фармацевтические композиции и методы их применения для лечения онкологических заболеваний, инфекционных состояний, вызванных бактериями, грибами и простейшими, а так же неинфекционных соматических заболеваний и состояний, связанных с накоплением соматических мутаций клетках организма. Изобретение описывает лекарственные и иммунологические композиции, а также сорбционные и физико-химические технологии и способы их применения для лечения злокачественных опухолей и других заболеваний.

IP20 Rec'd PCT/PTO 12 JAN 2006

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ, ИНФЕКЦИОННЫХ И
СОМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ И
5 КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ЛЕЧЕНИЯ

Область техники

Изобретение относится к медицине и ветеринарии и раскрывает
новый способ лечения онкологических, инфекционных и
неинфекционных заболеваний, при котором главной мишенью
10 терапевтического воздействия является свободно циркулирующая в
плазме крови (и других жидких средах) больного ДНК, происходящая из
находящихся в его организме опухолевых, мутантных, или
инфицированных бактериями, грибами, простейшими клеток, а также из
различных микроорганизмов. Описаны новые фармацевтические
15 композиции и методы их применения для лечения онкологических
заболеваний, инфекционных состояний, вызванных бактериями, грибами
и простейшими, а так же неинфекционных соматических заболеваний и
состояний, связанных с накоплением соматических в клетках организма.
Изобретение описывает лекарственные и иммунологические
20 композиции, а также сорбционные и физико-химические технологии и
способы их применения для лечения злокачественных опухолей и
профилактики их рецидива, а так же лечения инфекций, атеросклероза,
диабета и для замедления процесса старения. Предложенный способ
отличается новым принципом действия, повышенной эффективностью
25 противоопухолевого и противомикробного воздействия и может найти
применение в терапии онкологических заболеваний, различных
инфекций и неинфекционных соматических заболеваний.

Предшествующий уровень техники

Популяции опухолевых клеток, развивающиеся в организме больного,
30 обладают чрезвычайно высокой степенью генетической

изменчивости, намного превышающей таковую у здоровых клеток. Генетическая изменчивость популяций опухолевых клеток позволяет им в процессе заболевания генерировать фенотипы, нечувствительные к иммунному и морфогенетическому контролю, способные к инвазии и метастазированию и нечувствительные к противоопухолевой терапии. Считается, что селекционный отбор и клональная экспансия опухолевых клеток лежат в основе биологической и клинической “прогрессии” опухолей. В соответствии с этими представлениями, стратегия современной противоопухолевой терапии основана на принципе уничтожения клонов опухолевых клеток в организме больного с помощью методов – химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, хирургического удаления и различных их комбинаций. Все эти методы имеют одну общую фундаментальную особенность – конечной терапевтической мишенью воздействия является опухолевая клетка. Опыт подобной терапии свидетельствует, что вследствие высокой генетической изменчивости опухолевые клетки в основном приобретают нечувствительность к применяемой терапии до того, как используемая методика позволяет их полностью уничтожить.

Существует значительная потребность в новых противоопухолевых лекарствах, менее токсичных, чем большинство из ныне известных. Также имеется потребность в новых противоопухолевых препаратах, которые могут быть использованы для повышения эффективности ныне известных методов. Аналогично, существует значительная потребность в новых противоопухолевых лекарствах, которые могут быть использованы для снижения токсичности ныне известных методов лечения без уменьшения их эффективности.

Циркуляция молекул ДНК в плазме крови больных онкологическими заболеваниями и здоровых людей описана в ряде работ (P.Anker et al. , Clinica Chimica Acta ,v.313, 2001, pp143-146; Fedorov N.A.

et.al., Bull.Exp.Biol.Med.,v102,1986, pp281-283). Патент (US 5952170) описывает определение ДНК в плазме крови для диагностики и прогнозирования течения онкологических заболеваний Патенты (US 6465177 и US 6156504) описывают использование ДНК плазмы крови
5 для определения мутаций в онкогенах и микросателлитных участках генов, изучения геномной нестабильности в опухолях и использования результатов наблюдений для диагностики, мониторингирования и прогнозирования течения заболевания.

Sugihara S . et al.(1990, 1993) изучали влияние ферментов альфа
10 химотрипсина и дезоксирибонуклеазы I (ДНКазы I) на аутологичную и гетерологичную адгезию опухолевых клеток при метастазировании. Ими показано, что системное введение ДНКазы I приводит к замедлению роста метастазов. Однако выявленный эффект оказался недостаточным. Авторы делают вывод, что ДНКазы I может быть использована вместе с
15 хирургическим удалением опухоли для предотвращения гематогенного метастазирования. Идея авторов заключалась в воздействии на цитоплазматическую мембрану опухолевых клеток и не включала разрушения свободно циркулирующей ДНК. Используемые режим и дозы не могли вызвать продолжительного снижения уровня
20 циркулирующей ДНК.

Torchilin V.P. (2001), Патент US 5,780,033, заявляет использование аутоантител, способных связываться с цитоплазматическими и ядерными мембранами опухолевых клеток, и с протеин-ДНК комплексом, происходящим из мертвых опухолевых
25 клеток. Из текста заявки видно, что речь идет именно об антителах против белковых антигенных детерминант. В нашем случае используются анти-ДНК антитела и анти-ДНК абзимы. Кроме того, заявленная авторами терапия направлена против фагоцитоза нуклеосом на поверхности опухолевых клеток, что исключает формирование

адекватных терапевтических режимов, необходимых для связывания и выведения из циркуляции ДНК, находящейся в плазме.

Практически нет данных о циркуляции в крови бактериальной ДНК. В организме человека все микробы существуют в составе сообществ-биопленок (Davey M.E. O'toole G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to Molecular genetics. Microbiol. Mol.Genet. 64:847-867). Биопленки образованы микробными клетками, объединенными с помощью внеклеточного матрикса (Tetz V.V. 1999. Formation and structure of mixed bacterial communities. APMIS, 107:645-654). В составе матрикса биопленок нами обнаружена внеклеточная ДНК, попадающая туда из живых клеток. Наши данные свидетельствуют также, что бактериальная ДНК присутствует в плазме крови инфицированного человека, а её количество и состав могут изменяться при развитии определенных инфекций. Известно, что ДНК может попадать в окружающую среду также при гибели клеток, например в очаге воспаления. При этом, будучи полимером, ДНК значительно повышает вязкость материала (секрета), что негативно сказывается на течении заболевания, затрудняет удаление патогенов, токсинов, разрушенных клеток и.т.д. Известен лечебный препарат (Gentech –Roch) "Pulmosime", представляющий собой альфа-ДНК-азу, которая вводится ингаляционно, при лечении муковисцидоза. Эффект действия связан с местным разжижением секрета и не имеет отношения к нарушению транспорта генетической информации этими молекулами ДНК.

Систематический анализ спектра ДНК из крови людей и животных отсутствует. Данные исследований ДНК плазмы крови без проведения ПЦР в печати не обнаружены. Использование ПЦР может сильно исказить состав ДНК плазмы в силу специфичности праймеров, применяемых для амплификации. В связи с этим до последнего времени генетический анализ ДНК плазмы, проводился в основном при помощи

ПЦР или блот-гибридизации, и был направлен на изучение изменений в определённых участках генома (например в микростателлитах и отдельных генах) при опухолевом процессе (Sanchez-Cespedes M., et al., Ann Oncol, 1998, v9(1), pp113-116; Sozzi G., et al., Clin Can Res, 1999, v5(10), pp2689-2692; Chen X.Q., et al., Nat Med, 1996, v2(9), pp1033-1035).

Таким образом, отсутствуют знания о генетическом репертуаре ДНК, циркулирующей в плазме крови больных при онкопатологии, инфекциях, соматической патологии и у здоровых людей, ее биологической роли и возможном терапевтическом эффекте ее уничтожения или инактивации для лечения этих заболеваний.

Раскрытие изобретения

В результате работы над изобретением неожиданно было обнаружено, что ДНК, свободно циркулирующая в плазме крови онкологических больных, содержит уникальный по своему качественному и количественному составу репертуар генов и регуляторных генетических элементов, резко отличающийся от репертуара ДНК, описанного в геноме человека. ДНК плазмы крови онкологических больных содержит в основном уникальные гены человека, включая гены, ассоциированные с поддержанием и формированием «злокачественного» фенотипа. Показано, что ДНК плазмы крови онкологических больных участвует в межклеточном переносе генетической информации внутри популяции опухолевых клеток в организме больного. Настоящее изобретение раскрывает методы уничтожения или инактивации свободно циркулирующей в плазме ДНК, что приводит к подавлению развития раковой опухоли в организме. Изобретение так же включает в себя метод идентификации новых геномных последовательностей, вовлеченных в прогрессию опухолей и в функционирование генома человека. Этот аспект изобретения связан с

выделением, клонированием и сиквенированием образцов ДНК из плазмы крови онкологических больных и здоровых людей.

Обнаружено, что различные бактерии выделяют ДНК в матрикс биопленок, и она попадает в кровь и тканевую жидкость в организме человека и животных. Установлено, что наличие внеклеточной ДНК является одним из условий развития микробной инфекции.

Изобретение включает в себя уничтожение и(или) инактивацию циркулирующей микробной ДНК как метода лечения и профилактики, вызываемых ими заболеваний.

Также было обнаружено, что ДНК циркулирующая в крови здоровых людей играет существенную роль в развитии соматического мозаицизма, а ее связывание, разрушение или инактивация подавляют развитие соматического мозаицизма. Связывание, разрушение или инактивация ДНК, циркулирующей в плазме крови дает леченый эффект при заболеваниях, связанных с развитием соматического мозаицизма

Один аспект изобретения раскрывает фармацевтические композиции и нефармацевтические методы уничтожения или инактивации свободно циркулирующей ДНК в плазме крови больных при онкопатологии и инфекциях.

Другой аспект изобретения раскрывает способ лечения больных при онкопатологии, инфекциях, соматических заболеваниях и для продления жизни, связанный с введением им фармацевтических композиций или применением нефармацевтических методов, приводящих к уничтожению или инактивации свободно циркулирующей в плазме ДНК.

Еще один аспект изобретения раскрывает способ контроля эффективности лечения, направленного на уничтожение или инактивацию свободно циркулирующей в плазме ДНК, включающий мониторинг содержания ДНК в плазме крови и определение

наличия в ней опухолеспецифических или микробных генетических маркеров.

Описаны также способы лечения больных при онкопатологии и инфекциях, связанные с введением им фармацевтических композиций
5 или применением нефармацевтических методов, приводящих к уничтожению или инаktivации свободно циркулирующей в плазме ДНК, когда подобное лечение сочетается с применением стандартных методов противоопухолевой или противомикробной терапии.

Генетическая изменчивость раковых клеток, позволяющая
10 популяции раковых клеток быстро накапливать и поддерживать признаки, формирующие злокачественный «фенотип», проявляется на генном и хромосомном уровнях потерей, приобретением или изменением последовательностей ДНК – от единичных нуклеотидов до целых хромосом. (Loeb K.R. et.al., Carcinogenesis, v21,2000,pp.379-385).
15 Источником подобной изменчивости считается особый *modus operandi* генетического аппарата раковой клетки - значительно повышенная частота спонтанной мутационной изменчивости на фоне сниженной активности репарационных механизмов и отключения систем контроля генетического гомеостаза (Schmutte C., et al., Anticancer Res., 1999, v19, pp.4665-4696).
20 Считается, что «мутаторный» фенотип раковых клеток (Loeb L.A., Cancer Research, 2001, v61, pp.3230-3239), свойственная клонам раковых клеток динамическая гетерогенность (Heppner G.H. et al., International Review of Cytology, 1998, v177, pp.1-56) и многочисленные повторяющиеся раунды селекции раковых клонов в процессе прогрессии
25 опухоли (Cahill D.P. et al., Trends in Cell Biology, v9, pp.M57-M60 ; Rubin H., Adv Cancer Res, 2001, v83, pp.159-207; P. Nowell, Seminars in Cancer Biology, v 12, 2002, pp.261-266) приводят в конечном итоге к селекции и последующей экспансии наиболее злокачественного ракового клона. В соответствии с этими имеющимися знаниями современные методы

лечения злокачественных новообразований построены на принципе уничтожения опухолевых клеток в организме больного.

В процессе исследований было неожиданно обнаружено, что накопление генетических изменений, необходимых для формирования «злокачественного фенотипа» клинически продвинутой раковой опухоли является следствием кооперативного межклонального взаимодействия внутри популяции раковых клеток в организме больного, связанного с горизонтальным переносом генетической информации.

Мессенджером подобного кооперативного взаимодействия является свободно циркулирующая в плазме крови опухолевых больных ДНК, осуществляющая внутрипопуляционный межклональный перенос генов, участвующих в формировании «злокачественного фенотипа» популяции.

Разрушение или инактивация свободно циркулирующей в плазме ДНК приведет к тому, что популяция опухолевых клеток в организме не может поддерживать необходимый уровень генетической изменчивости и теряет способность поддерживать «злокачественный фенотип» (рост, метастазирование, нечувствительность к терапии). Подобное вмешательство имеет как самостоятельную терапевтическую ценность, так и повышает эффективность традиционных методов терапии.

Краткий перечень иллюстраций

Фиг.1 Результаты иммуногистохимического окрашивания гистологических срезов опухоли мышей получавших 5 дневный курс терапии Доксорубицином (2мг/кг ежедневно внутривенно) и I (0,5 мг/кг; четыре раза в день на протяжении 5 дней).

А - доксорубицин + ДНКаза

В - доксирубицин

Лучший вариант осуществления изобретения.

Выделение свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови.

Свежую (не более 3-4 часов после забора) плазму крови с добавленным антикоагулянтом (цитрат натрия) откручивали на подушке из Ficoll-PlaquePlus(Amersham-Pharmacia) при 1500g 20 минут при комнатной температуре. Плазму (1/2 от всего количества) аккуратно отбирали, не задевая остаток клеток на подушке фиколла и откручивали при 10 000 g 30 минут чтобы избавиться от обломков клеток и дебриса. Супернатант отбирали, не затрагивая осадок, добавляли до 1% саркозила, до 50мМ трис-HCl, pH 7,6, до 20 мМ ЭДТА, до 400 мМ NaCl, и равный объем смеси фенол-хлороформ 1:1. Полученную эмульсию инкубировали при 65°C 2 часа, затем отделяли фенол-хлороформ центрифугированием при 5000g в течении 20 минут при комнатной температуре. Процедуру депротеинизации фенол-хлороформом повторяли идентичным способом трижды, после чего водную фазу обрабатывали хлороформом, затем диэтиловым эфиром. Отделение от органических растворителей производили центрифугированием при 5000g в течении 15 минут. К полученной водной фазе добавляли равный объем изопропанола и инкубировали в течение ночи при 0°C. После осаждения нуклеиновые кислоты отделяли центрифугированием при 0°C, 10000g в течении 30 минут. Осадок нуклеиновых кислот растворяли в буфере, содержащем 10мМ трис-HCl , pH 7,6, 5 мМ ЭДТА, и наносили на подушку из ступенчатого хлористого цезия (1М, 2.5М, 5.7М) в центрифужной пробирке для ротора SW60Ti. Объем ДНК составлял 2 мл, объем каждой ступеньки CsCl – по 1 мл. Ультрацентрифугирование проводили в приборе L80-80 (Beckman) 3 часа при 250000 g. ДНК отбирали с поверхности ступеньки 5.7М по фракциям. Фракции диализировали 12 часов. Будет добавлено мМ трис-HCl, pH 7,6, 1мМ ЭДТА при 4°C. Наличие ДНК во фракциях определяли агарозным электрофорезом, с визуализацией ДНК бромистым этидием. Количество ДНК определяли спектрофотометрически (Beckman DU70) в кювете объемом 100мкл,

снимаемая спектр от 220 до 320 нм. Средний выход ДНК в расчете на 1 мл плазмы составлял 10-20 нг.

Клонирование и секвенирование ДНК плазмы крови

Нами был разработан новый метод выделения и клонирования ДНК из плазмы крови, позволяющий конструировать неамплифицированные плазмидные библиотеки такой ДНК с представительностью до миллиона клонов со средним размером в 300-500 пар оснований из 50 мл крови даже с учётом существенного присутствия в плазме различных больных повышенного уровня липополисахаридов и неидентифицированных примесей, существенно затрудняющих очистку нуклеиновых кислот. Таким образом, репрезентативный анализ можно проводить и с меньшими количествами образца плазмы – 10-20 мл в зависимости от присутствия патологических контаминантов. Выделенная по ранее описанному протоколу ДНК была подвергнута дополнительной тщательной депротеинизации с применением протеиназы К (Sigma) при 65°C для удаления прочно связанных белков. После депротеинизации и однократной обработки фенол-хлороформом при 65°C, ДНК осаждали 2,5 объемами этанола в течение ночи. Затем ДНК либо обрабатывали рестриктазой EcoRI в течение 3 часов, либо Pfu полимеразой (Stratagene) в присутствии 300 мкМ всех дезоксинуклеотидтрифосфатов для удаления «липких» концов. Достроенную ДНК фосфорилировали полинуклеотидкиназой T4 (30U, 2 ч.). Полученные препараты лигировали в плазмиду pBluescript (Stratagene), переваренную EcoRI или PvuII соответственно, и десфосфорилированную щелочной фосфатазой CIP (Fermentas) в течение 1 часа. Для лигирования обычно использовали 1 мкг вектора и 0,1-0,5 мкг сывороточной ДНК. Лигирование проводили при помощи Rapid Ligation Kit (Roche) 10 часов при 16°C. Объем лигазной смеси составлял 50 мкл. Лигированную библиотеку трансформировали в клетки DH12S

(Life Technologies) с применением электропоратора (BioRad). Для трансформации одной библиотеки использовали 12-20 электропорационных кювет. Для контроля на чашки с 1,5% агаром и средой LB, содержащей 100мкг/мл ампициллина высевали разведения библиотеки 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} . В обоих случаях представительность библиотеки составляла примерно $2-3 \times 10^6$ клонов. Теоретически, набор последовательностей ДНК, циркулирующих в плазме, должен соответствовать набору последовательностей ДНК генома. Апоптоз клеток в норме сопровождается практически количественной и неспецифической деградацией ДНК до её выхода из клетки, поэтому в плазме должны быть представлены наиболее часто встречающаяся ДНК – повторяющиеся элементы генома в пропорции соответствующей неспецифической деградации ДНК. К таким элементам относятся L1 повторы, сателлитная ДНК, повторы Alu, MER, MIR, THE, и некоторые другие. Количество уникальных последовательностей должно быть невелико, в соответствии с их малым процентом в геноме человека и может не детектироваться без ПЦР в клонированной ДНК.

Библиотека ДНК плазмы крови больного раком в клинически продвинутой стадии.

Мы сконструировали библиотеку ДНК плазмы крови пациента с диагностированной мезотелиомой в поздней стадии. Представительность библиотеки составила около 8.5×10^5 клонов, что вполне удовлетворительно, учитывая весьма небольшое (около $5\mu\text{g}$) количество ДНК, полученной после очистки от нехарактерных для здорового донора липополисахаридов, присутствовавших в плазме в сверхвысокой концентрации. Анализ 96 клонов длиной от 300 до 1000 пар оснований дал в высшей степени неожиданный результат. (Здесь следует отметить, что только один из проанализированных клонов не был идентифицирован, как человеческая ДНК, для остальных из

HumanGenBank была получена соответствующая информация, идентифицирующая ДНК этих клонов, как ДНК человека). Как указывалось выше, из имеющихся в литературе данных, логично было бы предположить значительную представленность в образцах ДНК

5 высокоповторяющихся элементов. Однако, по меньшей мере 55 из 96 клонов представляют уникальные последовательности ДНК человека. Учитывая реальное соотношение повторяющихся и уникальных элементов генома человека (примерно 95% к 5%) этот результат свидетельствует о том, что репертуар ДНК плазмы данного пациента

10 крайне отличен от состава ДНК в геноме. В данном случае наблюдается резкое обогащение препарата уникальными фрагментами ДНК.

Из 55 фрагментов уникальной ДНК, идентифицированных при секвенировании 96 клонов из библиотеки ДНК плазмы больного функция или продукт соответствующего гена были идентифицированы

15 для 15 последовательностей. Таблицы 1- 15 приводят перечень этих последовательностей и информацию об их участии в формировании и поддержании злокачественного фенотипа.

Таблица 1

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 24	Семейство рецепторных белков, связанных с G белком .	Ключевая роль в регуляции жизнедеятельности раковых клеток. Функционирование связано с клеточной трансформацией, подавлением апоптоза, нечувствительностью к гормонам и метастазированием	Steeg P.S. ,Nat Rew Cancer,2003,v.3, pp.55-63. Raj G.V. ,J Urology, 2002,v.167, pp.1458-1463. Hoff A.O., Neoplasia,1999 v.1, pp.485-491.

Таблица 2

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 43	Snf2-связанный СВР активатор (SCRAP)	Транскрипционный активатор. Гомологи связаны с развитием синовияльной саркомы и лейкемии.	Thaete C., Hum Mol Genet,1999,v.8,pp.5 85-91. Monroy M,A.,J Biol Chem.,2001,v.276, pp.40721-40726 Lee D.W., Cancer Res., 2000, v.60,pp.3612-3622.

Таблица 3

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 51	SRY-box содержащий ген	Транскрипционный модулятор . Экспрессируется в эмбриогенезе. Гомологи связаны с медуллобластомами, опухолями гонад, высокометастатическо й меланомой.	Graham J.D., J Mol endocrinol, 1999,v.22,pp.295- 304. Lee C.J.,J Neurooncol, 2002,v.57,pp.201- 214. Uehara S., Cancer Genet Cytogenet,1999,v.11 3.,pp.78-84. Tani M.,Genomics, 1997,v.39,pp.30-37

Таблица 4

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 72	Тирозин-киназа	Гомологи играют ключевую роль в клеточной регуляцией при раке. Ряд тирозинкиназ является продуктом клеточных онкогенов.	Hunter T. , Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1998,v.353.,pp.583-605. Scheijen B.,Oncogene, 2002,v.21.,pp.3314-3333.

Таблица 5

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 83	Fibroblast activation protein alpha; сериновая протеаза, связанная поверхностной мембраной.	Гомологи играют важную роль в инвазии и метастазировании раковых клеток. FAP активен в строме раковых опухолей и присутствует в карциномах различного происхождения.	Chen W.T, Enzyme Protein,1996,v.49.,p p.59-71. Scanlan M.J.,Proc Nat Acad Sci USA, 1994, v.91,pp.5657-5661. Mathew S., Genomics, 1995,v.25,pp.335-337.

Таблица 6

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 86	Brain testican	Протеогликан с неизвестной функцией. Связан со злокачественным фенотипом эмбриональной рабдомиосаркомы.	Genini M., Int J Cancer, 1996, v.66, pp.571- 577.

Таблица 7

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 152	KRAB domain, Zn-finger proteins	Гомологи известны как транскрипционные репрессоры. Экспрессия наблюдается в раннем эмбриогенезе, в клетках нейробластомы, Ewing саркоме, Т-клеточной лимфоме, в процессе прогрессии и приобретении лекарственной устойчивости при раке легкого.	Oguri T., Gene, 1998, v.222, pp.61-67 Gou D.M., Biochim Biophys Acta, 2001, v.1518, pp.306-310 Margolin J.F., Proc Nat Acad Sci USA, 1994, v/91, pp.4509-4513. Bellefroid E.J., EMBO J, 1993, v.12, pp.1363- 1374. Gonzales-Lamuno D., Pediatr Pathol Mol Med, 2002, v.21, pp.531- 540. Marilee J.W., Gene, 1994, v.152, pp.227- 232.

Таблица 8

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 190	Антиген, связанный с меланомой	Антиген, узнаваемый аутологичными инфильтрирующими опухоль лимфоцитами	J.Immunol.166(4),2871 -2877,2001

Таблица 9

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 167	N-cadherin	Участвует в процессах клеточной адгезии. Играет важную роль в процессах роста инвазии и метастазирования раковых клеток.	Hazan R.B.,J Cell Biol, 2000,v.148,pp.779-790. Li G.,Cancer Res, 2001,v.61,pp.3819- 3825. Tran N.L.,J Biol Chem, 2002,v.277,pp.32905- 32914.

Таблица 10

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 197	FAF1: Fas associated factor 1	Фосфопротеин известный как проапоптотический фактор.	Jensen H.H.,Int J Biochem Cell Biol, 2001,v.33,pp.577-589. Ryu S.W.,Biochem Biophys Res Commun, 2001,v.286,pp.1027- 1032.

Таблица 11

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 114	Интерлейкин-7	Цитокин. Предполагается, что он является необходимым паракринным-аутокринным фактором роста для многих типов рака..	Trinder P., Int J Oncol, 1999,v.14,pp.23-31. Cosenza L., Cell Signalling, 2002,v.14,pp.317-325.

Таблица 12

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 208	DEAD Box RNA helicase – like protein	Гомологи связаны с метаболизмом РНК. Экспрессируются в пролиферирующих раковых клетках.	Iggo R.D., Mol Cell Biol, 1991,v.11,pp.1326-1333. Causevic M., Oncogene, 2001,v.20,pp.7734-7743.

Таблица 13

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 97	Lipin 1	Один из регуляторов ответа раковых клеток на цитотоксические препараты.	Brachet A. et.al., Oncogene, 2002,v.21,pp.8361-8371

Таблица 14

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 121	Dynein	Принимает участие в транспорте белка p53, гиперэкспрессирован при раке простаты и гепатоцеллюлярном раке.	Bull J.H., et.al., Br J Cancer, 2001, v.84, pp.1512-1519. Giannakakou P., et.al., Nat Cell Biol, 2000, v.2, pp.709-717 Jiang J., et.al., Gene, 2001, v.281, pp.103-113.

Таблица 15

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 178	Белок Ramp	Связан с развитием клеток человеческой эмбриональной карциномы.	Cheung W.M., et.al., J Biol Chem, 2001, v.276, pp.17083-17091

Таким образом, из 15 последовательностей с идентифицированной функций или продуктом, кодирующих самые разнообразные продукты (протеинкиназы, ростовые факторы, протеиназа, регуляторные ядерные белки, адгезионные молекулы), 14 описаны в литературе, как имеющие отношение к формированию и поддержанию злокачественного фенотипа. Лишь продукт клона 197, идентифицированный как проапоптотический фактор, формально не установлен как фактор, связанный со злокачественной прогрессией. Однако, ряд литературных данных свидетельствует о возможной связи высокого индекса апоптотической активности раковой опухоли с ее прогрессией (Nishimura R., et al., J Surg Oncol, 1999, v.71, pp.226-234.) и о возможной роли факторов,

индуцирующих апоптоз, в формировании и поддержании иммуносупрессии при злокачественном росте (O'Connel J., et al., Dis Esophagus, 1999, v.12, pp.83-89).

Наиболее представленной из повторяющихся элементов в данном
5 препарате оказалась альфа-сателлитная ДНК (30 клонов). Можно сказать, что по отношению к другим секвенированным последовательностям, альфа-сателлитная ДНК оказалась единственным высокоповторяющимся элементом генома человека, ведущим себя в составе данного образца, именно как повтор. Остальные высокоповторяющиеся элементы либо
10 присутствовали в виде одного или нескольких клонов (вариант L1, и MLT2b), либо не обнаружены среди проанализированных образцов (MER, Alu, TNE, MIR, β -сателлиты). Если исходить из имеющихся знаний, что состав ДНК плазмы должен в основном повторять состав ДНК генома, то перечисленные повторы должны были быть
15 представлены в подавляющем числе клонов, в то время как уникальные и умеренно повторяющиеся последовательности вообще не должны обнаруживаться при анализе столь малого числа клонов ДНК. Полученный результат ясно свидетельствует об особом пути образования ДНК плазмы у ракового больного. На это указывает и
20 другой неожиданный результат проведённого анализа - обнаружение в данном препарате фрагментов сразу двух новых умеренно повторяющихся последовательностей неизвестного до недавнего времени типа - дубликонов. Дубликоны были впервые обнаружены в геноме человека менее двух лет назад. Известные дубликоны (Eichler
25 E.E., et al., Genome Res, 1998, v8, pp.791-808; Ji Y., et al., Genome Res, 2000, v.10, pp.597-610; Pujana M.A., et al., Genome Res, 2001, v.11, pp.98-111) – значительные по размеру участки ДНК, размноженные в числе нескольких копий преимущественно в рамках какой-то одной хромосомы (в отличие от других повторов, которые достаточно

равномерно распределены по геному). Образование и экспансию дупликонов сейчас связывают и с различными генетическими синдромами (например с синдромом Прадера-Вилли/Ангельмана, и с эволюцией мультигенных семейств, таких как MHC (Shiina T., et al., Proc Nat Acad Sci USA, 1999, v.96, pp.13282-13287), и с хромосомной нестабильностью в опухолях .

Следует отметить, что анализ клонов из ДНК плазмы крови больного дал следующие неожиданные результаты.

ДНК плазмы крови больного раком высокообогатена уникальными генами. Из 96 проанализированных клонов 55 клонов содержат фрагменты уникальных генов человеческого генома. Из 15 последовательностей с известной функцией, идентифицированных в библиотеке, 14 генов имеют отношение к процессам прогрессии опухолей и поддержанию злокачественного фенотипа.

В препарате ДНК плазмы обнаружено резкое обеднение по наиболее распространённым повторам человека, таким как MER, Alu, TNE, MIR, β -сателлиты.

Весьма важным результатом является обнаружение в препарате двух последовательностей с характеристиками ранее не известных дупликонов, что свидетельствует о представленности дупликонов в подобных образцах ДНК .

Библиотека ДНК плазмы крови здорового донора

Для подтверждения ценности метода клонирования и секвенирования ДНК плазмы крови для идентификации уникальных генетических последовательностей генома, мы сконструировали библиотеку ДНК плазмы крови здорового донора. Известно, что плазма клинически здоровых людей так же содержит ДНК, правда в значительно меньшем количестве, чем плазма раковых больных (Shapiro B., et al.,

Cancer, 1983, v. 51, pp. 2116-2120). Представительность библиотеки составила около 8×10^5 клонов.

Анализ 70 клонов длиной от 300 до 1000 пар оснований дал еще более интересный результат. Из 70 проанализированных клонов 58
5 представляют собой уникальные последовательности ДНК генома человека. Из них по данным HumanGenBank лишь для 14 определена функция или продукт соответствующего гена.

Всего 12 клонов содержали фрагменты повторяющихся последовательностей, при этом без предпочтения в отношении альфа-
10 сателлитной ДНК.

Таким образом, неожиданно установлено, что ДНК плазмы крови здорового и больного раком содержит в основном уникальные фрагменты генома человека. При онкологической патологии уникальные последовательности ДНК из плазмы крови соответствуют генам,
15 продукты которых участвуют в формировании злокачественного «фенотипа» опухолевых клеток.

Основываясь на этом нашем неожиданном открытии, мы предположили, что ДНК циркулирующая в плазме крови больных может являться мессенджером горизонтального переноса генетической
20 информации при опухолевых заболеваниях, способствуя накоплению и распространению в популяции опухолевых клеток генов, необходимых для формирования и поддержания «злокачественного фенотипа».

Соматический мозаицизм — состояние являющееся следствием присутствия в организме генетически неидентичных популяций
25 соматических клеток. По современным представлениям, многие неопухолевые и неинфекционные (т.н. соматические) заболевания человека (например диабет, атеросклероз, хронические неспецифические заболевания легких и другие), в том числе и процесс старения человека, связывают с появлением и распространением (экспансией) в процессе

развития индивидуума клонов соматических клеток, несущих «мутантные» гены. (Youssoufian H., et al., Nature Rew. Genet., 2002,v.3,pp.748-758; J.Vijg, Mutation Res.,2000,v.447,pp.117-135; R.Erickson, Mutation Res.,2003,v.543,pp.125-136; Andreassi M.,Mutation Res.,2003,v.543,pp.67-86;Anderson G., et al., Trends in Pharmacological Sci.,2003.,v.24,pp.71-76). Ярким примером подобного процесса служит прогрессия митохондриальной гетероплазмии (экспансия мутантной митохондриальной ДНК) при различных заболеваниях и в процессе старения (E.Jazin et al., Proc Nat Acad Sci USA, 1996, v.93,pp.12382-12387; Michikawa Y. Et al.,Science,1999,v.286,pp.774-779; Calloway C. Et al.,Am J Hum Gen,2000,v.66,pp.1384-1397).

В качестве двух альтернативных моделей возникновения соматического мозаицизма рассматривают возможность появления множественных мутаций «de novo» в поликлональной клеточном пуле либо клональную экспансию мутантного клона клеток (Khrapko K., et al., Mutation Res.,2003,v.522,pp.13-19).

В процессе работы над изобретением нами обнаружено, что ДНК циркулирующая в крови здоровых людей играет существенную роль в развитии соматического мозаицизма, а ее связывание, разрушение или инактивация подавляют развитие соматического мозаицизма. Связывание, разрушение или инактивация ДНК, циркулирующего в плазме крови дает леченый эффект при заболеваниях, связанных с развитием соматического мозаицизма.

Приведенные ниже примеры показывают роль ДНК, циркулирующей в плазме крови больных в развитии нечувствительности опухолей к химиотерапии, развитии метастатического процесса при развитии сепсиса и ряде других патологических состояний. Обнаружен высокий терапевтический эффект от уничтожения, связывания или инактивации ДНК плазмы крови.

Роль свободно циркулирующей ДНК в прогрессии опухолей

Материалы и методы.

Использовалась бычья панкреатическая ДНКаза I (Fermentas) и рекомбинантная человеческая ДНКаза I (Дорназа; Genetech). Раствор ДНКазы для введения готовился растворением матричного раствора ДНКазы в стерильном фосфатном буфере непосредственно перед введением. Циклофосфамид и Доксорубицин разводились в соответствии с указанием инструкции.

В проведенных сериях опытов *in vitro* мы не наблюдали подавляющего эффекта ДНКазы I рост культур опухолевых клеток (при концентрации ДНКазы I до 100 мкг/мл), ДНК плазмы крови мышей-опухоносителей получали в соответствии с методикой описаной ранее.

Использовали высокометастатический и низкометастатический штаммы мышинной карциномы легких Люиса и карциномы Эрлиха. Клетки росли в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% пенициллин-стрептомицина в среде с 5% углекислого газа. Для индукции опухолей у мышей клетки выращивали до монослоя, отделяли с помощью раствора трипсин-ЭДТА. Клетки трижды отмывали центрифугированием в фосфатном буфере и ресуспендировали до $0,5 \times 10^7$ в 1 мл. Жизнеспособность определяли по включению метиленового синего в гемоцитометре. Для введения животным использовали суспензии, содержащие не менее 95% жизнеспособных клеток. Использовали мышей линии C57B1, и белые беспородные, полученные из питомника «Рапполово». Вес животных составлял 24-26 грамм. Животные содержались по 6-7 штук в клетке на стандартной диете без ограничения воды. Клетки LLC в дозе 5×10^5 в 100 мкл. фосфатного буфера вводили в мягкие ткани бедра. Опухоль Эрлиха перевивали под кожу правого бока введением 0,2 мл 10% -ной взвеси клеток в изотоническом растворе хлорида натрия

В некоторых экспериментах исследовали содержание ДНК в плазме крови мышей. ДНК выделяли по ранее описанному протоколу. Содержание ДНК измеряли спектрофотометрически.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами:

5 Пример 1.

Влияние ДНК азы I при ежедневном двукратном введении на рост опухоли Эрлиха у мышей.

Группа 1 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха (контроль).

Группа 2- 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших

- 10 ДНКазу два раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 1мг/кг внутрибрюшинно в 200 мкл фосфатного буфера.

Группа 3 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу два раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 2 мг/кг внутрибрюшинно в 200 мкл фосфатного буфера.

- 15 Результаты экспериментов оценивали по торможению роста опухоли (ТРО), выраженному в процентах к данным контроля, полученных в последний день введения ДНКазы с использованием стандартной формулы.

Размер опухоли через 7 дней после перевивки

Группа	Объем опухоли	Т%	Р
1	86+/-12	-	-
2	33+/-6	61%	p<0,001
3	34+/-7	60%	p<0,001

- 20 Полученные данные указывают, что введение ДНК азы вызывает выраженное торможение развития опухоли у мышей.

Пример 2

Использование различных схем введения ДНКазы для торможения развития опухоли Эрлиха.

В наших экспериментах терапевтической мишенью ДНКазы является ДНК, циркулирующая в плазме крови больных. Для обеспечения наибольшего терапевтического эффекта необходимо длительное присутствие ДНКазы в плазме крови в каталитически эффективных количествах. В связи с этим многократное введение ДНКазы должно давать лучший эффект по сравнению с двукратным ее введением в той же суточной дозе.

- Группа 1 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха (контроль).
 Группа 2- 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу два раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 1 мг/кг внутривенно в 200 мкл фосфатного буфера.
 Группа 3 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу четыре раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 0,5 мг/кг внутривенно в 200 мкл фосфатного буфера. Результаты экспериментов оценивали по торможению роста опухоли (ТРО), выраженному в процентах к данным контроля, полученных в последний день введения ДНКазы с использованием стандартной формулы.

Размер опухоли через 7 дней после перевивки

Группа	Объем опухоли	Т%	Р
1	98+/-14	-	-
2	23+/-6	76	P<0,001
3	32+/-6	67%	P<0,001

- Полученные данные указывают, что дробное (четырёхкратное) введение ДНКазы при той же суммарной суточной дозе действительно вызывает более значительное угнетение роста опухоли, чем двукратное введение. Содержание ДНК в плазме крови мышей 2 группы по окончании курса лечения составило 38,3 нг/мл, в то время как у мышей контрольной группы 104,8 нг/мл; у мышей 3 группы – 55,1 нг/мл. У здоровых мышей

- содержание ДНК в плазме составило 12,0 нг/мл. ($p < 0,01$). Таким образом, многократное введение ДНКазы в течение суток приводит к более выраженному снижению содержания ДНК в плазме больных животных и более выраженному подавлению роста опухоли, по сравнению с 2х
- 5 кратным введением той же суточной дозы.

Пример 3

- Совместное использование ДНК азы и противоопухолевого препарата доксорубицина. Группа 1 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха (контроль). Группа 2- 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха,
- 10 получавших Доксорубицин один раз в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 2мг/кг внутривенно. Группа 3 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу четыре раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 0,5 мг/кг внутрибрюшинно в 200 мкл фосфатного буфера и Доксорубицин
- 15 один раз в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 2мг/кг внутривенно. Группа 4-10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу четыре раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 0,5 мг/кг внутрибрюшинно в 200 мкл фосфатного буфера. Результаты экспериментов оценивали по
- 20 торможению роста опухоли (ТРО), выраженному в процентах к данным контроля, полученных в последний день введения ДНКазы с использованием стандартной формулы.

Размер опухоли на 7 день после перевивки

Группа	Объем опухоли	T%	P
1	98+/-14	-	-
2	57+/-10	42	$P < 0,05$
3	20+/-6	78	$P < 0,01$
4	0	100%	

Полученные данные указывают, что доксорубицин самостоятельно угнетает рост опухоли слабее чем ДНКазы. При совместном применении проявляется выраженный синергизм между ДНКазой и доксорубицином, выражающийся в полном подавлении роста опухолей (опухоли не
5 определялись не у одного из экспериментальных животных).

Пример 4.

Влияние ДНК азы на формирование бактериальной биопленки.

Для выявления возможных механизмов действия ДНК-азы на взаимодействие бактерий с организмом хозяина мы оценили её влияние
10 на формирование биопленок.

Эксперименты проводили на модели биопленок, получаемых на поверхности стекла при лабораторном культивировании. Были использованы неродственные грамположительные (*Staphylococcus aureus* VT-209) и грамотрицательные (*Escherichia coli* ATCC25922)
15 бактерии. Бактерии засевали в синтетическую среду М9 с добавками, необходимыми для использованных штаммов бактерий, в количестве 10^9 бактерий/мл и инкубировали при 37°C на протяжении 72 часов. ДНК-азу добавляли в количество 100 мкг/мл сразу после внесения бактерий. В контроле добавляли идентичный объем фосфатного буфера. Отдельные
20 флаконы отбирали для анализа каждые 24 часа.

Стекла промывали PBS буфером, фиксировали, окрашивали метиленовым синим и изучали с помощью световой микроскопии.

В результате установлено, что в присутствии ДНКазы не происходило образование нормальной биопленки. Наблюдалось только прилипание к
25 стеклу отдельных микроорганизмов, которое не приводило к образованию микроколоний и биопленок.

Контрольные высевы из флаконов для определения числа в них жизнеспособных бактерий, способных образовывать колонии на плотной

среде (КОЕ), показало, что в присутствии ДНКазы не происходит гибели клеток, приводящей к снижению числа КОЕ по сравнению с контролем. Таким образом, полученные данные указывают, что ДНКазы не вызывает гибели стафилококков и эшерихий, но мешает их кооперативному поведению, приводящему к формированию биопленок.

Пример 5.

Использование ДНК азы для лечения экспериментального сепсиса.

Исследование проводили на беспородных белых мышах 24-26 гр. Животным в ретроорбитальный синус вводили патогенный штамм *Staphylococcus aureus* VT-2003R в количестве 1×10^{10} бакт/животное. ДНК азу вводили внутривентриально. В контрольной группе по аналогичной схеме вводили изотонический раствор хлорида натрия или пенициллин. Каждая группа включала 10 животных. Введение препарата продолжалось 1-3 дня со дня заражения 4 раза в день по 500 мкг/кг внутривентриально. Пенициллин вводили внутримышечно. Эффективность действия оценивали по числу животных, выживших после гибели последнего погибшего в контрольной группе. В контрольной группе к 3 дню погибли все зараженные животные. Среди животных, получавших ДНК-азу к 3 дню остались живы 6 животных. Защита составила - 67%. Полученные данные указывают на возможность и эффективность использования ДНК азы для лечения инфекционных состояний.

Пример 6.

Уровень свободно циркулирующей в плазме ДНК у онкологических больных и у здоровых доноров.

ДНК плазмы крови онкологических больных и ДНК плазмы крови здоровых доноров отличаются не только своим генетическим репертуаром, но и количеством ДНК, содержащейся в плазме крови. В таблице ниже приведены данные по содержанию ДНК в плазме крови у

10 больных различными формами опухолей и 10 здоровых добровольцев. Выделение ДНК из плазмы и определение концентрации ДНК проводили по протоколу, описанному ранее.

Пациент	Пол, возраст	Опухоль, стадия	Содержание ДНК; нг\мл
1	М, 67	Карцинома легкого T2N2M0	123
2	Ж, 37	РМЖ T2N0M0	78
3	Ж, 53	Карцинома желудка T3N2M1	90
4	М, 54	РТК T2N2M2	340
5	М, 64	РТК T2N1M0	182
6	М, 56	Карцинома легкого T3N2M1	99
7	Ж, 49	РТК T2N1M0	75
8	М, 65	Карцинома желудка T3N1M0	120
9	М, 36	Остеогенная саркома T3N1M2	243
10	Ж, 50	РМЖ T3N1M0	165
11	М, 24	Доброволец	10
12	М, 32	Доброволец	27
13	Ж, 21	Доброволец	45
14	Ж, 19	Доброволец	7
15	Ж, 21	Доброволец	13
16	Ж, 23	Доброволец	89
17	М, 28	Доброволец	11
18	Ж, 32	Доброволец	15
19	Ж, 25	Доброволец	17
20	М, 38	Доброволец	5

- 5 Из таблицы видно, что содержание ДНК в плазме крови здоровых добровольцев значительно ниже, чем в плазме больных различными формами злокачественных новообразований.

Пример 7

Последовательности ДНК клонов, полученных из ДНК свободно циркулирующей в плазме больного злокачественной мезотелиомой.

Клон 1

5 Дупликон, хромосома 15 и Y

Последовательность №1.

Клон 3

Уникальный, хромосома 2

Последовательность №2

10 Клон 8

MLT2B повтор

Последовательность №3

Клон 9

Центромерная сателлитная ДНК

15 Последовательность №4

Клон 10

MLT2B повтор

Последовательность №5

Клон 20

20 L1MC4-like (LINE-элемент)

Последовательность №6

Клон 15

Алфа-сателлитная ДНК

Последовательность №7

25 Клоны 18, 21

Алфа-сателлитная ДНК

Последовательность №8

Клон 24

Уникальный, семейство G protein-связанных белков, хромосома 6

- Последовательность №9
Клон 25
Уникальный, хромосома 3
Последовательность №10
- 5 Клон 26
SatB1/Vimentin/nuclear matrix связывающая ДНК
Последовательность №11
Клон 33
Дупликон, хромосома 10
- 10 Последовательность №12
Клон 32
Альфа-саттелитная ДНК
Клон 35
LTR повтор
- 15 Последовательность №13
Клон 36
Уникальный, хромосома 18
Последовательность №14
Клон 37
- 20 Уникальный, хромосома 4
Последовательность №15
Клон 41
Последовательность №16
Клон 43
- 25 Snf2-related CBP activator protein (SCRAP) Уникальный, хромосома 16.
Последовательность №17
Клон 45
Уникальный , хромосома 3
Последовательность №18

- Клон 47
Альфа-сателлитная ДНК
Клон 51
Уникальный, SRY-бокс содержащий ген
- 5 Последовательность №19
Клон 52
Повтор
Последовательность №20
Клон 53, 55
- 10 Альфа-сателлитная ДНК
Последовательность №21
КЛОН 56
ЦЕНТРОМЕРНЫЙ ПОВТОР
Последовательность №22
- 15 Клон 60
Повторяющийся на нескольких хромосомах ген, содержит MER5A
повтор.
Последовательность №23
Клон 62
- 20 Повтор
Последовательность №24
Клон 65
Уникальный, хромосома 3
Последовательность №25
- 25 Клон 71
Уникальный, хромосома 2
Последовательность №26
Клон 72
Уникальный, хромосома 8

- Последовательность №27
Клон 73
Уникальный
Последовательность №28
- 5 Клон 78
Transposon Tigger фрагмент
Последовательность №29
Клон 81
Последовательность №30
- 10 Повтор (LINE)
Клон 82
Уникальный , хромосома 1
Последовательность №31
Клон 83
- 15 Уникальный ,Fibroblast activation protein alpha; cell surface serine protease,
хромосома 2
Последовательность №32
Клон 79
Альфа-сателлитная ДНК
- 20 Клон 86
Уникальный, высокая гомология с brain testican , хромосома 4
Последовательность №33
Клон 90
Уникальный, хромосома X
- 25 Последовательность №34
Клон 93
Уникальный, хромосома 9
Последовательность №35
Клоны 89 и 92

- Альфа-саттелитная ДНК
Клон 96
Фрагмент LINE.
Последовательность №36
- 5 Клон 97
Уникальный, хромосома 2, Lipin
Клон 98
Уникальный, хромосома X
Последовательность №38
- 10 Клон 102
Уникальный, хромосома 17
Последовательность №39
Клон 99
Альфа-саттелитная ДНК
- 15 Клон 105
Уникальный, хромосома 13
Последовательность №40
Клон 106
Уникальный, хромосома 9
- 20 Последовательность №41
Клон 107
Уникальный, хромосома 8
Последовательность №42
Клон 111
- 25 Уникальный, хромосома 12
Последовательность №43
Клон 112
Уникальный, хромосома 5
Последовательность №44

- Клон 114
Уникальный, хромосома 8, Interleukin 7
Последовательность №45
Клон 116
- 5 Уникальный, хромосома 1
Последовательность №46
Клон 121
Уникальный, хромосома 5, Dynein
Последовательность №47
- 10 Клон 115; 119;120
Альфа-саттелитная ДНК
Клон 125
Уникальный, хромосома 9
Последовательность №48
- 15 Клон 127
Уникальный, хромосома 20
Последовательность №49
Клон 130
Уникальный, хромосома не определена.
- 20 Последовательность №50
Клон 124
SatB1/Vimentin/nuclear matrix связывающая ДНК
Клон 133
Альфа-саттелитная ДНК
- 25 Клон 137
MLT1A2 повтор
Последовательность №51
Клон 140
Уникальный, хромосома 2, zinc finger protein, subfamily 1A

- Последовательность №52
Клон 141
Уникальный, хромосома 2
Последовательность №53
- 5 Клон 143
Фрагмент Alu-повтора
Последовательность №54
Клон 144
Уникальный, хромосома 2
- 10 Последовательность №55
Клон 146
Уникальный, хромосома 4
Последовательность №56
Клон 139 и 142
- 15 Альфа-сателлитная ДНК
Клон 148
Повтор (хромосомы 1,2 и 4)
Последовательность №57
Клон 152
- 20 Уникальный, хромосома 16, KRAB-Domain, zinc finger protein
Последовательность №58
Клон 154
Уникальный хромосома 9
Последовательность №59
- 25 Клон 161
Фрагмент LINE
Последовательность №60
Клон 151
Уникальный, хромосома 5

- Последовательность №61
Клон 150
Уникальный, хромосома 1
Последовательность №62
- 5 Клон 153
Уникальный, хромосома 11
Последовательность №63
Клон 159
Уникальный, хромосома 6
- 10 Последовательность №64
Клон 163
Альфа-сателлитная ДНК
Последовательность №65
Клон 166
- 15 Уникальный, хромосома 12
Последовательность №66
Клон 167
Уникальный, хромосома 18 , cadherin 2, type 1, N-cadherin
Последовательность №67
- 20 Клоны 169, 170
Уникальный, хромосома 18
Последовательность №68
Клон 178
Уникальный, хромосома 1, RAMP: RA-regulated nuclear matrix-associated
- 25 protein
Последовательность №69
Клон 180
Уникальный, хромосома 20
Последовательность №70

- Клон 181
Уникальный, хромосома 18
Последовательность №71
Клон 185
- 5 Альфа-сателлитная ДНК
Последовательность №72
Клон 187
Мег повтор
Последовательность №73
- 10 Клон 188
HSATIII повтор
Последовательность №74
Клон 189
Уникальный, хромосома 9
- 15 Последовательность №75
Клон 190
Уникальный, хромосома 1, melanoma antigen recognized by T cells 2
Последовательность №76
Клон 195
- 20 Уникальный, хромосома 10
Последовательность №77
Клон 196
Уникальный, хромосома X
Последовательность №78
- 25 Клон 197
Уникальный, хромосома 1, FAF1: Fas (TNFRSF6) associated factor 1
Последовательность №79
Клон 200
Уникальный, хромосома 8

- Последовательность №80
Клон 202
Уникальный, хромосома 13
Последовательность №81
- 5 Клон 205
Альфа-сателлитная ДНК
Последовательность №82
Клон 206
Повтор
- 10 Последовательность №83
Клон 208
Уникальный, хромосома 8, Human DEAD box RNA helicase-like protein
Последовательность №84
Пример 8. Последовательности ДНК клонов, полученных из свободно
- 15 циркулирующей в плазме здорового донора ДНК.
Клон 1
Уникальный, хромосома 5
Последовательность №85
Клон 9
- 20 Уникальный, хромосома 21
Последовательность №86
Клон 7
Уникальный, хромосома 3
Последовательность №87
- 25 Клон 8
Уникальный, хромосома 4
Последовательность №88
Клон 10

- 18S RNA ген
Последовательность №89
Клон 11
Повтор Alu
- 5 Последовательность №90
Клон 13
Уникальный, хромосома 3
Последовательность №91
Клон 15
- 10 Уникальный, хромосома 1
Последовательность №92
Клон 16
Уникальный, хромосома 3, neutral endopeptidase
Последовательность №93
- 15 Клон 17
Уникальный, хромосома 8
Последовательность №94
Клон 18
Уникальный, хромосома 1
- 20 Последовательность №95
Клон 21
Уникальный, хромосома 19, Zinc Finger protein
Последовательность №96
Клон 22
- 25 Уникальный, хромосома 18
Последовательность №97
Клон 23
Уникальный, хромосома 7, muskelin 1
Последовательность №98

- Клон 25
Уникальный, хромосома 11
Последовательность №99
Клон 27
- 5 Повтор
Последовательность №100
Клон 29
Уникальный, хромосома 6
Последовательность №101
- 10 Клон 30
Уникальный, хромосома 14
Последовательность №102
Клон 31
Уникальный, хромосома 17
- 15 Последовательность №103
Клон 32
MER4B повтор
Последовательность №104
Клон 33
- 20 Уникальный, хромосома 1
Последовательность №105
Клон 34
Уникальный, хромосома 2
Последовательность №106
- 25 Клон 35
Повтор
Последовательность №107
Клон 36
Уникальный, хромосома 1

- Последовательность №108
Клон 37
HERVH повтор
Последовательность №109
- 5 Клон 41
Уникальный, хромосома X
Последовательность №110
Клон 42
Уникальный, хромосома 6
- 10 Последовательность №111
Клон 43
Уникальный, хромосома 22, KREMEN1
Последовательность №112
Клон 44
- 15 Уникальный, хромосома 14
Последовательность №113
Клон 45
Уникальный
Последовательность №114
- 20 Клон 46
Уникальный, хромосома 20
Последовательность №115
Клон 47
Nf-карраВ
- 25 Последовательность №116
Клон 38
Уникальный, хромосома 16
Последовательность №117
Клон 48

- Уникальный, хромосома 6
Последовательность №118
Клон 53
Уникальный
- 5 Последовательность №119
Клон 51
Уникальный, хромосома 5
Последовательность №120
Клон 59
- 10 Уникальный, хромосома 4, NFkB1: nuclear factor of kappa light
polyreptide gene enhancer
Последовательность №121
Клон 61
Повтор
- 15 Последовательность №122
Клон 62
L1 повтор
Последовательность №123
Клон 64
- 20 Дубликон, хромосома 7
Последовательность №124
Клон 65
Рибосомальная ДНК
Последовательность №125
- 25 Клон 66
Рибосомальная ДНК
Последовательность №126
Клон 75
Повтор

- Последовательность №127
Клон 76
Уникальный, хромосома 4
Последовательность №128
- 5 Клон 83
Уникальный, хромосома 4
Последовательность №129
Клон 85
Уникальный, хромосома 2, phospholipase C, epsilon
- 10 Последовательность №130
Клон 87
L1PA3 повтор
Последовательность №131
Клон 86
- 15 Уникальный, хромосома 5, CRTL1: cartilage linking protein 1
Последовательность №132
Клон 89
Alu повтор
Последовательность №133
- 20 Клон 92
Уникальный, хромосома 6
Последовательность №134
Клон 100
Уникальный, хромосома 6
- 25 Последовательность №135
Клон 105
AluSx повтор
Последовательность №136
Клон 111

- Alphoid repetitive ДНК
Последовательность №137
Клон 112
Уникальный, хромосома 9
- 5 Последовательность №138
Клон 113
Уникальный, хромосома 22
Последовательность №139
Клон 114
- 10 AluSx повтор
Последовательность №140
Клон 116
Уникальный, хромосома 9, 17kD fetal brain protein
Последовательность №141
- 15 Клон 123
Уникальный, хромосома 5
Последовательность №142
Клон 124
Уникальный хромосома 13
- 20 Последовательность №143
Клон 126
Уникальный, хромосома 8
Последовательность №144
Клон 130
- 25 Уникальный, хромосома 1
Последовательность №145
Клон 131
Уникальный, хромосома 4
Последовательность №146

- Клон 136
Уникальный, хромосома 8
Последовательность №147
Клон 141
- 5 Уникальный, хромосома 2
Последовательность №148
Клон 146
Уникальный, хромосома 16
Последовательность №149
- 10 Клон 147
Уникальный, хромосома 5, nicotinamide nucleotide transhydrogenase
Последовательность №150
Клон 149
Уникальный, хромосома 9
- 15 Последовательность №151
Клон 151
Уникальный, хромосома 16
Последовательность №152
Клон 152
- 20 Уникальный, хромосома 6, BAI3: brain-specific angiogenesis inhibitor 3
Последовательность №153
Клон 153
Уникальный, хромосома 10, GAD2: glutamate decarboxylase 2
Последовательность №154
- 25 Клон 155
Уникальный, хромосома 9
Последовательность №155
Пример 9
Чувствительность ДНК, циркулирующей в плазме, к действию ДНКаз.

ДНК из сыворотки свежей крови доноров (смесь от 5 доноров) выделяли стандартным фенол-хлороформным методом.

Осадок нуклеиновых кислот промывали 70% этанолом и растворяли в трис-ЭДТА буфере. Количество ДНК определяли по данным
5 спектрофотометрии при длине волны 260 нм (СФ-46). Полученную ДНК изучали электрофорезом в 0,8% полиакриламидном геле с окраской бромистым этидием. Часть полученной ДНК обрабатывали ДНКазой I в течение 3 часов при 37°C. В результате разделения в геле обработанной и необработанной ДНК установлено:

10 Необработанная ДНК образует после электрофореза одну компактную полосу, что свидетельствует о сравнительно идентичных по размеру фрагментах ДНК, циркулирующих в крови.

После обработки ДНКазой полоса в геле исчезает полностью.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что в сыворотке
15 циркулирует ДНК, чувствительная к действию ДНКаз, и что она может быть ими полностью разрушена.

Пример 10

Результаты эксперимента по влиянию поликлональной сыворотки, содержащей антитела против ДНК на продолжительность жизни мышей
20 с карциномой Эрлиха.

ДНК, циркулирующая в плазме крови онкологических больных может быть уничтожена или инактивирована не только разрушающими ДНК ферментами (например, ДНКазой), но и другими способами.

Антитела против ДНК выделяли из крови больных системной красной
25 волчанкой по методике Shuster A.M.(Shuster A.M. et.al.,Science,v.256,1992,pp.665-667). Подобные анти-ДНК антитела способны не только связывать, но и осуществлять гидролиз ДНК.

Группа 1 – 7 мышей с привитой карциномой Эрлиха (контроль).

Группа 2- 6 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получивших на 3й день после перевивки опухоли внутривенную инъекцию фракции человеческих анти ДНК антител (IgG) по 200 мкг на одно животное.

Группа 3- 6 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получивших на 3й день после перевивки опухоли внутривенную инъекцию фракции неспецифического человеческого иммуноглобулина (IgG) по 200 мкг на одно животное.

Эффект определяли по торможению роста опухоли на 7 день после перевивки (ТРО, выраженное в процентах)

10 Размер опухоли через 7 дней после перевивки

Группа	Объем опухоли	Т%	Р
1	85+/-12	-	-
2	45+/-6	52%	p<0,001
3	79+/-7	7%	p<0,001

Результаты показывают, что однократное введение антител против ДНК обладает выраженным противоопухолевым эффектом. Введение фракции антител, не содержащих антител, направленных против ДНК, не вызывает противоопухолевого эффекта.

Пример 11

Эффект вакцинации мышей фракцией ДНК плазмы крови, полученной от животных с карциномой Эрлиха, на перевивку и рост карциномы Эрлиха у иммунизированных животных.

20 ДНК из плазмы мышей с карциномой Эрлиха выделяли по описанной выше методике на 5 й день после перевивки опухоли. В качестве адьюванта для иммунизации использовали положительно заряженные многослойные липосомы. Образец ДНК смешивался с липосомами (20 мкг ДНК в 1 мг липидов).

25 Группа 1 – 6 неиммунизированных мышей

Группа 2 – 6 мышей, иммунизированных трехкратно внутрикожно с интервалом в 1 неделю (1мкг ДНК из плазмы крови в 50мкл липосомальной суспензии, содержащей 50мкг липосом).

Группа 3- 6 мышей, иммунизированных трехкратно внутрикожно с интервалом в 1 неделю 50 мкл липосомальной суспензии, содержащей 50мкг липосом без ДНК.

Группа 4- 6 мышей, иммунизированных трехкратно внутрикожно с интервалом в 1 неделю (1мкг ДНК телячьего тимуса (Sigma) в 50мкл липосомальной суспензии, содержащей 50 мкг липосом).

10 Через неделю после последней иммунизации всем мышам, включая неиммунизированный контроль, была перевита опухоль Эрлиха.

Результаты эксперимента оценивали по выживаемости животных на 30 и 50 день после перевивки опухоли.

Группа	30 день (число живых \ павших животных в группе)	50 день (число живых \ павших животных в группе)
1	0-6	0-6
2	5-6	3-6
3	0-6	0-6
4	2-6	0-6

15 Таким образом, иммунизация мышей ДНК из плазмы крови приводит к выраженному увеличению продолжительности жизни животных, привитых опухолью Эрлиха.

Пример 12

Выделение ДНК из матрикса биопленок, образованных грамположительными и грамотрицательными бактериями.

20 В опытах использованы биопленки, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Биопленки смывали с агара фосфатным буфером, после чего клетки и матрикс разделяли центрифугированием. Для выделения ДНК

из матрикса использовали стандартный фенол-хлороформный метод. Количество ДНК определяли по данным спектрофотометрии при длине волны 260 нм (СФ-46). Полученную ДНК изучали электрофорезом в 0,8% полиакриламидном геле с окраской бромистым этидием. Часть

5 полученной ДНК обрабатывали ДНК азой 1 в течение 3 часов при 37°C. В результате разделения в геле обработанной и необработанной ДНК установлено:

Необработанная ДНК образует после электрофореза одну компактную полосу, что свидетельствует о сравнительно идентичных по размеру

10 фрагментах ДНК, присутствующих в матриксе.

После обработки ДНК азой полоса в геле исчезает полностью.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что матрикс микробных сообществ грамположительных и грамотрицательных бактерий содержит внеклеточную ДНК, которая может быть разрушена

15 ДНКазой.

Пример 13

Динамика экспрессия Р-гликопротеина в опухоли Эрлиха у мышей, получающих терапию Доксорубицином, в процессе лечения и эффект ДНКазы I.

20 Лечение Доксорубицином вызывает в ткани опухоли экспрессию Р гликопротеина, одного из основных медиаторов MDR (Multidrug Resistance) фенотипа. Ниже приведены результаты иммуногистохимического окрашивания гистологических срезов опухоли мышей получавших 5 дневный курс терапии Доксорубицином (2мг/кг

25 ежедневно внутривенно) и Доксорубицином + ДНКазы I (0,5 мг/кг; четыре раза в день на протяжении 5 дней). Лечение начинали на 3й день после перевивки опухоли. Препараты тканей изготавливались на 8 день после перевивки опухоли. После 5 дневного курса терапии в тканях опухоли наблюдается интенсивная многоочаговая экспрессия Р-

гликопротеина (Фиг.1). При комбинированном лечении Доксорубин + ДНКазы как общий уровень экспрессии Р-гликопротеина так и количество Р-гликопротеин позитивных очагов в ткани опухоли значительно меньше (Фиг.1). Таким образом, лечение ДНКазой тормозит
5 в опухоли развитие фенотипа множественной лекарственной устойчивости, вызываемое действием противоопухолевого антибиотика Доксорубина.

Пример 14

Влияние ДНК плазмы мышей C57Bl с опухолью LLC , подвергшихся
10 химиотерапевтическому лечению Доксорубином на рост и метастазирование опухоли LLC у мышей C57Bl , получающих терапию Доксорубином и эффект ДНКазы 1.

Опухоль LLC была перевита 30 мышам C57Bl. На 3 день после перевивки 20 мышей получили курс химиотерапии Доксорубином в
15 дозе 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течении 5 дней, и 10 мышей получили терапию Циклофосфамидом в дозе 15 мг/кг однократно внутривенно на 3 день после перевивки. Подобный курс лечения не приводит к излечению животных, но приводит к замедлению роста опухоли на 8 день на 50% у животных, получивших химиотерапию
20 Доксорубином и к замедлению роста опухоли на 8 день на 30% у животных , получивших химиотерапию Циклофосфамидом.

На следующий день после окончания курса химиотерапии животных усыпляли, собирали суммарную плазму крови мышей 1 группы и мышей 2 группы. Суммарную фракцию ДНК плазмы крови после выделения
25 хранили при -20°C в фосфатном буфере.

В эксперименте участвовало 5 групп мышей, привитых LLC.

1 группа – 7 мышей контроль

2 группа – 6 мышей химиотерапия Доксорубином по схеме 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течении 5 дней с 3 по 8 день.

- 3 группа – 6 мышей химиотерапия Доксорубицином по схеме 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течении 5 дней с 3 по 8 день + внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции ДНК мышей, получивших химиотерапию Доксорубицином (0,05 мкг ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в 1 й день лечения).
- 5 4 группа - 6 мышей химиотерапия Доксорубицином по схеме 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течении 5 дней с 3 по 8 день + внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции ДНК мышей, получивших химиотерапию Циклофосфамидом (0,05 мкг ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в 1 й день лечения)
- 10 5 группа - 6 мышей химиотерапия Доксорубицином по схеме 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течение 5 дней с 3 по 8 день + внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции ДНК мышей, получивших химиотерапию Доксорубицином (0,05 мкг ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в 1 й день лечения) + внутрибрюшинное четырехкратное введение ДНКазы I в дозе 0,5мг/кг в 1й и 2й день лечения (по 4 внутрибрюшинных инъекции в сутки)
- 15

Размер опухоли на 8 день после перевивки

Группа	Объем опухоли
1	127+/-13
2	67+/-7
3	115+/-20
4	75+/-11
5	82+/-9

- Таким образом, ДНК плазмы крови мышей, получавших химиотерапию, специфическим образом способствует развитию лекарственной устойчивости опухолей к химиотерапевтическому лечению. Введение ДНКазы препятствует реализации этого эффекта.
- 20

Пример 15

Влияние ДНК плазмы мышей C57Bl с высокометастатическим штаммом опухоли LLC, на метастазирование низкометастатического штамма опухоли LLC у мышей C57Bl, и эффект ДНКазы 1.

Опухоль LLC была перевита 30 мышам C57Bl. Мыши (20
5 животных) получили прививку высокометастатического штамма и 10
мышей получили прививку низкометастатического штамма. На 9 день
после перевивки окончания курса химиотерапии животных усыпляли, и
собирали суммарную плазму крови мышей 1 группы и мышей 2 группы.
Суммарную фракцию ДНК плазмы крови хранили при -20°C в
10 фосфатном буфере.

В эксперименте участвовало 5 групп мышей, привитых опухолью LLC.

1 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC.

2 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC +
15 внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции
ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг
ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в на 7й и 8й день после перевивки).

3 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC +
внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции
20 ДНК мышей с привитым низкометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК
в 200 мкл фосфатного буфера в на 7й и 8й день после перевивки)

4 группа - 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC +
внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции
ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг
25 ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в на 7й и 8й день после перевивки)
+ внутрибрюшинное четырехкратное введение ДНКазы I в дозе 1мг/кг
на 7й и 8й день лечения (по 2 внутрибрюшинных инъекции в сутки)

5 группа – 6 мышей с привитым высокометастатическим штаммом LLC.

Оценивалось количество метастатических узлов в легких на 15 день после перевивки (N).

Результаты эксперимента представлены в таблице

Группа	Нср.
1	12,0
2	24,1
3	14,6
4	11,6
5	33,6

- Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что ДНК из
- 5 плазмы мышей с высокометастатическим штаммом LLC усиливает метастазирование низкометастатического штамма LLC. Введение больным животным ДНКазы I препятствует реализации этого эффекта.

Пример 16

- 10 Влияние ДНКазы I на продолжительность жизни мышей C57Bl с привитой опухолью LLC (высокометастатический штамм).
- В эксперименте участвовало 5 групп мышей, привитых LLC.
- 1 группа – 7 мышей (контроль).
- 2 группа – 6 мышей, получавших внутрибрюшинно терапию ДНКазой в
- 15 дозе 1 мг/кг 2 раза в сутки с 3 по 5 день после перевивки
- 3 группа – 6 мышей, получавших внутрибрюшинно терапию ДНКазой в дозе 1 мг/кг 2 раза в сутки с 3 по 10 день после перевивки.
- 4 группа – 6 мышей, получавших терапию ДНКазой в дозе 1 мг/кг 2 раза в сутки с 3 по 15 день после перевивки.
- 20 5 группа – 6 мышей, получавших терапию ДНКазой в дозе 1 мг/кг 2 раза в сутки с 3 по 18 день после перевивки.

Результаты эксперимента оценивали по выживаемости животных на 30 и 50 день после перевивки опухоли.

Группа	30 день (число живых \ павших животных в группе)	50 день (число живых \ павших животных в группе)
1	0-7	0-7
2	0-6	0-6
3	3-6	0-6
4	5-1	3-3
5	6-0	6-0

Хотя во 2ой и в 3ей группах наблюдалось выраженное торможение роста опухолей к последнему дню лечения ДНКазой, после отмены препарата
 5 рост опухоли возобновлялся и к 25 дню размер опухолей в этих группах сравнивался с контролем.

Наиболее длительный курс терапии ДНКазой (с 3 по 18 день; группа 6) привел к максимальному продлению жизни больных животных. Торможение роста опухоли к 18 дню составляло более 95%)

10 Во всех экспериментах однократное и многократное введение человеческой ДНКазы I в дозе до 2,5 мг/кг. (наибольшая доза, использованная в экспериментах) не оказывало токсического действия на животных.

Таким образом, ДНКазы I не оказывает прямого цитотоксического
 15 действия на опухолевые клетки (в наших экспериментах в концентрации 100 мкг/мл опытах *in vitro*), а полученные в примере данные подтверждают, что противоопухолевый эффект связан с разрушением ДНК в плазме крови, и лечебный эффект ДНКазы возрастает вместе с увеличением продолжительности курса лечения ДНКазой.

Пример 17

Влияние различных способов разрушения, инактивации и связывания ДНК плазмы крови на способность ДНК плазмы крови мышей C57Bl с высокометастатическим штаммом опухоли LLC усиливать
5 метастазирование низкометастатического штамма опухоли LLC у мышей C57Bl.

Мыши (100 животных) получили прививку высокометастатического штамма опухоли LLC. На 9 день после перевивки и окончания курса химиотерапии животных усыпляли и собирали суммарную плазму крови
10 мышей. Суммарная фракция ДНК плазмы после выделения крови хранилась при -20°C в фосфатном буфере.

В эксперименте участвовало 6 групп мышей, привитых низкометастатическим штаммом LLC.

- 1 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC
- 15 2 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворялись в 500 мкл свежей гепаринизированой крови).
- 20 3 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл. свежей плазмы). Перед введением образец подвергали фотохимической
25 дезинфекции (добавление 1 мкМ метиленового синего с последующим облучением красным светом в течении 10 минут ($\sim 60\,000$ Люкс).
- 4 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим

штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл свежей плазмы). Перед введением образец дважды пропускали через колонку, содержащую DEAE-целлюлозу. 5 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл свежей гепаринизированной крови). Перед введением в образец добавляли 1 мкг фрагмента А растительного токсина Рицина и инкубировали 1 час при 37°C. Рицин является представителем семейства RIP (белки инактивирующие рибосомы) токсинов, широко используемых для создания иммунотоксинов. Кроме способности инактивировать рибосомы эти белки обладают способностью деаденилировать ДНК. Для реализации токсического эффекта каталитическая единица А токсинов RIP II типа должна быть доставлена в клетку субъединицей В. В отсутствие субъединицы В цепь А не токсична, однако полинуклеотид-аденингликозидазная активность цепи А может быть использована для инактивации ДНК, циркулирующей в плазме.

6 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл свежей гепаринизированной крови). ДНК. Суммарная фракция ДНК перед введением подвергалась ферментативному метилированию (I.Muiznieks et.al., FEBS Letters, 1994, v.344, pp.251-254).

Оценивали количество метастатических узлов в легких на 15 день после перевивки.

Результаты эксперимента приведены в таблице.

Группа	Нср.
1	12,0
2	22,5
3	14,1
4	15,5
5	15,1
6	12,3

Результаты свидетельствуют, что все примененные методы подавляли способность ДНК плазмы крови мышей с высокометастатическим штаммом опухоли LLC вызывать усиление метастазирования низкометастатического штамма опухоли LLC.

- 5 Пример 18. Влияние терапии ДНКазой I на развитие соматического мозаицизма.

В качестве модели соматического мозаицизма была изучена частота мутаций гена HPRT в Т-лимфоцитах крови. Человеческий HPRT ген (Хромосома Xq26) кодирует конститутивно экспрессируемый, но не эссенциальный фермент, вовлеченный метаболизм пуриновых оснований. Клонирование проводили по методике описанной Bigbee W (Bigbee W. Et al., Mutation Res.,1998,v.397,pp.119-136). Клонированию подвергались лимфоциты периферической крови 8 больных, получавших курс 3х недельной иммуностимулирующей терапии препаратом Неовир

10 после хирургического удаления опухоли. Из 8 больных 4 пациента дополнительно получали терапию человеческой рекомбинантной ДНКазой I (200 мкг/кг внутривенно, 4 раза в сутки в течении 3 недель). Частота встречаемости HPRT-дефицитных клонов в крови больных, получавших терапию ДНКазой I, в среднем была в 3 раза ниже таковой в

15 крови больных , получавших только иммуностимулирующую терапию.

20

Пример 19. Влияние терапии ДНКазой I на продолжительность жизни старых крыс.

В опыте использовали 24-месячных белых беспородных крыс. В опытной группе (10 животных) крысам, начиная с 24 месячного возраста, вводили полисиалированную человеческую ДНКазу I в количестве эквивалентном 500мг/кг немодифицированного фермента внутривенно два раза в неделю на протяжении 2 месяцев. Крысам контрольной группы вводили плацебо. Продолжительность жизни крыс в контрольной группе составила в среднем 27, 8 месяца. Продолжительность жизни крыс в опытной группе составила в среднем 30,1 месяц.

Пример 20 . Влияние терапии ДНКазой I на жизнеспособность бета-клеток поджелудочной железы и эндотелия аорты

Бета-клетки эмбриональной поджелудочной железы человека и эндотелиальные клетки аорты человека использовали для формирования первичной клеточной культуры. Через 24 часа после пассажа в одной экспериментальной серии в клеточные культуры добавляли ДНК, выделенную из плазмы больного тяжелой формой диабета 2 типа, осложненного системным атеросклерозом (0,0025 мкг на 1 мл культуральной среды) а в другой экспериментальной серии ДНК больного перед введением в культуру подвергали ферментативному метилированию. Через 24 часа оценивали содержание жизнеспособных клеток по включению красителя трипанового синего.

Результаты эксперимента приведены в таблице:

Процентное содержание жизнеспособных клеток через 48 часов после пассирования .

Клетки	Контроль	ДНК больного	Метилированная ДНК
В-клетки	73%	43%	61%
Эндотелий	62%	35%	55%

Промышленная применимость

Таким образом, настоящее изобретение свидетельствуют о том, что разрушение (связывание, инактивация) ДНК, циркулирующей в плазме крови, при онкологических и микроб индуцированных

5 заболеваний дает выраженный лечебный эффект.

В подтверждение найденного эффекта установлено, что ДНК плазмы крови больных содержит уникальные гены, принимающие участие в формировании и поддержании злокачественного фенотипа опухоли.

10 Связывание, разрушение или инактивация ДНК, циркулирующей в плазме крови дает леченый эффект при заболеваниях, связанных с накоплением и распространением в клетках организма соматических мутаций.

1. ДНК, циркулирующая в плазме крови, может быть уничтожена,

15 инактивирована или удалена из плазмы крови, что может быть достигнуто использованием ДНКаз, сорбентов, антител или других методов, приводящих к инактивации разрушением, связыванием или модификацией циркулирующей ДНК.

Лечение, направленное на уничтожение ДНК плазмы крови,

20 приводит к выраженному противоопухолевому эффекту при незначительной собственной токсичности.

Лечение, направленное на уничтожение ДНК плазмы крови, в сочетании с традиционными методами противоопухолевой терапии приводит к выраженному противоопухолевому эффекту.

25 Эффективность лечения, направленного на уничтожение ДНК плазмы крови, может определяться путем мониторингирования количества ДНК и генетических маркеров опухоли в плазме крови пациента, получающего такое лечение.

Клонирование и секвенирование ДНК плазмы крови онкологических больных может быть использовано для изучения генетических процессов, участвующих в онкогенезе и идентификации новых генов, связанных с процессами онкогенеза.

- 5 Клонирование и секвенирование ДНК плазмы крови здоровых людей может быть использовано для изучения процессов функционирования генома в норме и при развитии соматических заболеваний и идентификации новых генов, вовлеченных в эти процессы
- 10 Фармацевтические композиции, содержащие компоненты инактивирующие разрушением, связыванием или модификацией ДНК плазмы крови, используются для лечения больных злокачественными опухолями, инфекциями, соматическими заболеваниями или для продления жизни. Для осуществления эффективной терапевтической экспозиции действующего компонента, необходимой для разрушения
- 15 ДНК плазмы и достижения терапевтического эффекта, используются фармацевтически приемлимые композиции и модификации, системы доставки лекарств, обеспечивающие максимальную системную циркуляцию действующего компонента в плазме крови и его контакт с ДНК, циркулирующей в плазме. Основной путь введения –
- 20 внутривенный. Однако могут быть использованы другие методы введения, обеспечивающие поступление действующего компонента в системную циркуляцию - подкожный, внутримышечный, ингаляционный, внутрибрюшинный и др. Дозы и режимы введения при этом определяются природой используемого активного ингредиента,
- 25 зависят от пути введения. Эффект контролируется по уровню содержания и динамике ДНК в плазме крови, наличием в нем опухолевых, инфекционных и других генетических маркеров, и наступлением положительной клинической динамики заболевания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний путем воздействия на биологические мишени
5 внутри организма, отличающийся тем, что биологической мишенью является внеклеточная ДНК, в том числе, циркулирующая в плазме крови.
2. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по п.1, отличающийся тем, что внеклеточная
10 ДНК инактивируется разрушением, связыванием или модификацией.
3. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1 или 2, отличающийся тем, что внеклеточная ДНК инактивируется разрушением, связыванием или модификацией путем введения в организм больного фармацевтического
15 агента, способного разрушать, связывать или модифицировать свободно циркулирующую ДНК.
4. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по одному из пп.1-3, отличающийся тем, что внеклеточная ДНК инактивируется разрушением, связыванием или
20 модификацией путем введения в организм больного фармацевтического агента, в количестве, достаточном для разрушения и терапевтическом режиме обеспечивающем разрушение, связывание или модификацию в течение периода времени, достаточного для достижения желаемого терапевтического эффекта.
- 25 5. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по одному из пп.1-4, отличающийся тем, что в организм больного вводят генетически модифицированные клетки или генотерапевтические конструкции, приводящих к синтезу в организме больного биополимеров, способных инактивировать путем связывания,

разрушения или модификации свободно циркулирующую в плазме крови больных ДНК.

6. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1 или 2, отличающийся тем, что
5 внеклеточная ДНК, циркулирующую в плазме инактивируется путем разрушения связывания или модификации экстракорпоральными методами очистки крови.
7. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1,2 или 6, отличающийся тем, что
10 экстракорпоральная очистка крови больного от свободно циркулирующей ДНК достигается иммунной или аффинной сорбцией.
8. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1,2 или 6, отличающийся тем, экстракорпоральная очистка крови больного от свободно
15 циркулирующей ДНК достигается методами гравитационной хирургии крови.
9. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1,2 или 6, отличающийся тем, что экстракорпоральная очистка крови больного от свободно
20 циркулирующей ДНК достигается биологической, химической или фотохимической инактивацией.
10. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1 или 2, отличающийся тем, что больного иммунизируют вакциной, содержащей в качестве антигена
25 ДНК, свободно циркулирующую в плазме больного, в том числе, в комплексе со связанными с ней белками.
11. Способ лечения онкологических заболеваний по одному из пп.1-10, отличающийся тем, лечение сочетается с хирургическими,

химиотерапевтическими, гормональными, лучевыми
иммунотерапевтическими методами.

12. Фармацевтический агент для лечения онкологических и/или
инфекционных и/или соматических заболеваний, представляющий собой
5 вещество, обладающее дезоксирибонуклеазной активностью и/или
способное инактивировать внеклеточную ДНК, в том числе,
циркулирующую в плазме крови больных.

13. Фармацевтический агент по п. 12, отличающийся тем, что вещество,
обладающее дезоксирибонуклеазной активностью, представляет собой
10 фермент дезоксирибонуклеазу.

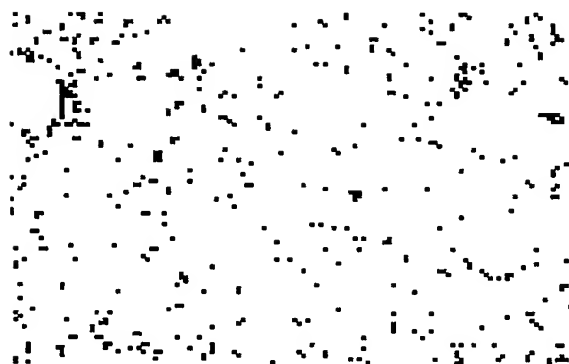
14. Фармацевтический агент по п. 13, отличающийся тем, что
дезоксирибонуклеаза модифицирована для достижения лучших
фармакодинамических и фармакокинетических показателей и
представляет собой аналог дезоксирибонуклеазы с повышенной
15 активностью, аналог дезоксирибонуклеазы, нечувствительный к
эндогенным ингибиторам дезоксирибонуклеазы, полисиалированную
дезоксирибонуклеазу, пегилированную дезоксирибонуклеазу,
дезоксирибонуклеаза связанную или смешанную с фармацевтически
приемлемым носителем, в том числе, с синтетическими и природными
20 микросферами, липосомами, декстраном, и другими корпускулярные
природными и синтетическими полимерными носителями.

15. Фармацевтический агент по одному из пп. 12-14, отличающийся
тем, что он дополнительно содержит рибонуклеазу и/или липазу и/или
протеиназу.

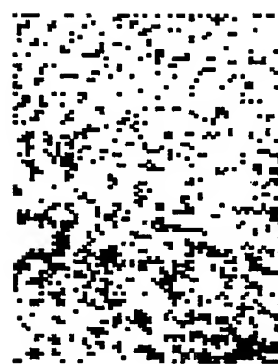
25 16. Фармацевтический агент по п. 12, отличающийся тем, что вещество,
обладающее дезоксирибонуклеазной активностью представляет собой
антитела, обладающие нуклеазной активностью, в частности -
поликлональные ДНК-абзимы, моноклональные ДНК – абзимы или их
производные.

17. Фармацевтический агент по п. 12, отличающийся тем, что вещество, способное связывать ДНК, представляет собой антитела, способные связывать ДНК и его комплексы или их производные
18. Фармацевтическая композиция для лечения онкологических и
5 инфекционных заболеваний, содержащая фармацевтический агент по одному из пп. 12-16 в терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.
19. Способ увеличения продолжительности жизни, отличающийся тем, что достигается путем, инактивации внеклеточной ДНК циркулирующей
10 в плазме за счет разрушения связывания или модификации по п. 2-17.
20. Способ профилактики возникновения и развития патологий, связанных с возникновением и развитием соматического мозаицизма за счет разрушения связывания или модификации ДНК по п. 2-17.
21. Метод контроля эффективности лечения онкологических и/или
15 инфекционных и/или соматических заболеваний, а также оценки развития инфекции и контроля эффективности лечения, направленного на продление жизни путем измерения биохимических показателей больного, отличающийся тем, что для контроля подобного лечения используется мониторинг количества, размера молекул,
20 соотношение фракций, связи с белками, липидами и сахарами, последовательности нуклеотидов ДНК, свободно циркулирующей в плазме крови.
22. Использование ДНК плазмы крови и внеклеточной микробной ДНК для выявления ДНК, вовлеченной в процесс возникновения и развития
25 заболеваний, состоящее в её клонировании, секвенировании, идентификации генов, уникальных и повторяющихся последовательностей с их последующим изучением.

1/1



A



B

Фиг.1

IAP20 Rec'd PCT/PTO 12 JAN 2006

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Tets Viktor Veniaminovich, Genkin Dmitry Dmitrievich
 <120> Способ лечения онкологических, инфекционных и соматических заболеваний, методы контроля эффективности лечения, фармацевтические агенты и композиция для осуществления лечения
 <210> 1
 <211> 485
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 1
 acgacggcca gtgagcgcgc gtaatacgac tcactatagg gcgaattggg taccggggccc 60
 cccctcgagg tgcacgggat cgataagctt gatatcgaat tctgaccacc ccaagggtggc 120
 catccttgtc cctgtgattc cagatctcca gaactggagg tctagcttca gggaaaaccc 180
 agattttctt ggcttagccc acctgacagc taatcactgg aaatggggtg ggctggtaga 240
 gtccttttgt caggttttgt gtcaagagag ggaggaggaa agatgggagg gaggtagcaa 300
 aactggcttc aatggaacta tgtaagttaa tatagaatgg caaagggatg tttcttccaa 360
 ggaagaatt cctgcagccc ggggatcca ctagttctag agcggccgcc accgcggtgg 420
 agctccagct tttgttcctt ttagtgaggg ttaattgcgc gcttggcgta atcatggtca 480
 tagct
 <210> 2
 <211> 244
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 2
 gaattctcaa attattactg aggaaaatgt gacagtgcct caaagcagta gtaatttttt 60
 ctcatatgc tgcatttatt attaaaacca acagtggaca gtgaatgact aactgatcct 120
 tttttgggaa tattacttcc aaatgaacgt taacttaaag attggaatat gaacacacta 180
 ttgcttttac actagagagg ttactcctgg ccactcttcc agcagcagtt agcttcagga 240
 attc
 <210> 3
 <211> 230
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 3
 gaattcgag taacttcctt gtgttggtgt tattcaactc acagagtiga acgatcgttt 60
 acacagagca gacttgaaac actctttttg tggaatttca agtggagatt tcaattgttt 120
 gaggtcaatg gtagaatagg aaatatcttg ctatagaaac tagacagaat gattctcaga 180
 aactcctttg tgatgtgtgc cttcaactca cagagttaa cttttctttt
 <210> 4
 <211> 218
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 4
 gaatttcat gaaattgaaa tggatggact catcatcgaa tggattcgaa tggaatcatc 60
 gaataaaatt gattgag(a)at catcatcaaa tggaatcgaa tggatcatt gaatggaatc 20
 gaatggaatc atcatcagat ggaaatgaat ggaatcgtca tagaatccaa tcgaatggat 180
 tcattgaatg gaatcagatg gaatcatoga gtgactga
 <210> 5
 <211> 182
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 5
 gaatttcta caggacaga actaatggaa tatatgtatt atacagggga gtttattaaa 60
 cattaactca catgatcaca aggtcccga ataggctgtc tgcaggcagg ggcgaaggag 120
 gccagtgaag ttccaaaact caagaacctt gagtcaatgt tcaagggc(?)a ggaagcatcc180

2/24

ag
 <210> 6
 <211> 152
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 6
 gaattcacag aaatcattgc cacaggcaag atctgatgaa ccttgatgaa tgctaaaatt 60
 agttggtgaa agtttaagca gaaacagaat gtttgcataag aatgaagcaa aagaaggaaa 120
 aaaaattatg agcccttgat ttaggggtct tt
 <210> 7
 <211> 131
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 7
 gaattcttct gtctagagta acatgaagaa atcccgtttc caacgaaggc cctcaaggcg 60
 gtcaattatc cacttcgaga ttctacagaa agagtgtttc aaaactgctc tatcaagaga 120
 aatgttccac c
 <210> 8
 <211> 239
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 8
 gaattcccag taacttcctt gtgttggtga cattcaactc acagagttga acgttccctt 60
 agacagagca gatttgaaac actctttttg tgcaattggc aagtggagat ttcaagcgct 120
 ttaaggtcaa tggcagaaaa gaaatatct tcgtttcaaa actagacaga atcattcca 180
 caaactgcgt tgtgatgtgt tcgttcaact cacagagttt aacctttctt ttcataagag
 <210> 9
 <211> 207
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 9
 gaattctctta gacttccttg ggttttagcgc tgagtgaaga ggcacggaga gggtttgag 60
 ctttagggta aagcactgat ggaagaaagg aattcctgca gcccgggga tccactagtt 120
 cttagcgggc cgccaccgcg gtggagctcc agcttttggt cccttttagtg agggttaaaa 180
 gcgcgcttgc gtaatcatgg tcatagc
 <210> 10
 <211> 223
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 10
 gaattcatcg ctaggactgt gttcttgttt attgggatgg gaaggagag aaaagatgag 60
 aggggcaaaa gagaaaattt tggaaaatga gaaacttact ttattgcact gtctgtgcaa 120
 ttgttggtct taaggaacaa atacactaaa ttcaaagatg ataaaaaaaa aaacagctt 180
 cacagagctg tagtaaacac cagatgttga aagagaagcg tat
 <210> 11
 <211> 198
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 11
 gaattccatt tgatgacaat tccattcaat accaattgat gatgtttatt tttgattcca 60
 tttgatgatg attacattcg attccatttc atcatgattc cattcgattc cactcgatga 120
 ttccattoga ttccattcaa tgattattcc acttgagtcg attcgatgac tccattcgat 180
 tgtattcgat ggtgattg
 <210> 12
 <211> 217

3/24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

```

gaattctgcc aagcagtgac ttgattcatg aacactcact ggatgctgac tctgttgctc 60
ttctgagtgc tggggtagag gagaggatga ggtggacgca cagttcttgc ttttatgagc 120
ttatgttcta ggaaattcaa acaagtattt tttcaggcag gtagtatgaa atagcaggaa 180
gaggaagcag gctaaagga cacagagtga ttggggg

```

<210> 13

<211> 223

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

```

gaattcaggg ctgcagaaat ttgtgtaagt aaagaggagc agaatgttaa tagccaagac 60
aatgcaaaaa atgcattcaa ggtgttttga aaccttcatt gtagccctc ccattacaag 120
cctggaggnc tgggagggaa aaataatccc tgaaccagga caagggccct atccctattt 180
ctctgtacag tctcaggaca cagcactttg catcccagca gct

```

<210> 10

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

```

gaattcgctt acagtcagtt acaaatgctt tttagatctt caatgcttct gtgaagcctc 60
atatttgctg ttcagacaga cactataatg gagatggaat aaatggacag caactacaca 120
ggacggtgtg ggcagatggt gttggagcga ggggtgcagg tggagccac aggagaggaa 180
ggctgattga tcttctatgg ggagagcttc atagcacggg ggtggggcac acctgactgg 240
caagctgttt ggtgtgag

```

<210> 15

<211> 239

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

```

gaattctttt gaactagctg tgttttgaca gaggtttttt tttttttttt tctttttttg 60
gttttttgct tctctgacaa aggccttttg aagaatgagc ttcttcccc acatctttat 120
ttatttatat atttttaagc tatgtctcagg aaaatgaaca tttctccttt gcagttgata 180
acagcattta caaggtatac agcatatagg gttgttccaa attccttccc agataacca

```

<210> 16

<211> 226

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

```

gaattcctga atgggtggg(5)5 6actgtgtgt ctctggccct attccctctc caggacaaac 60
ctcacccttt cctgcaaag tactcaaaat agtacattta tccacgtcaa ttcagcaaag 120
gctgcagatc ctgggactac agtatctcag acgctgttct cagcgagctc atggtccagt 180
ggagagcaca gacaaacagc aaggcaggag aaatcgctc tgaagagccc agggag

```

<210> 17

<211> 156

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

```

gaattcagcc gtggcagtga gatggagtgt gtgtttagaa ctgttgattg atctggctct 60
ccctgattag gaggccgaga tcgagactcg gattgctgag ctgcggaagg agggtttctg 120
gtcactgaag aggctgccta aggtgccaga gcccc

```

<210> 18

<211> 191

<212> DNA

4/24

<213> Artificial Sequence

<400> 18

gaattctaca aaagaaataa agcagagatg tgaaaggaat ttcttcaact atacacattt 60
 tgacataatc atcttctaac atggtgttta atttgctctg cttcacttag caatgatata 120
 atgaatatatt cccattttat tatatatctt acaatatcac tttgaatgac tctcttaaga 180
 gtgtattata c

<210> 19

<211> 312

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

cgacggccag tgagcgcgcg taatacgact cactataggg cgaattgggt accgggcccc 60
 ccctcgaggt cgacggtatc gataagcttg atatcgcttg tgctgctgaag gatgcaattc 120
 tagacagagt tagctgggaa tgcctcactg agaagggggc atttgagtaa aggcctgaaa 180
 aggtgaagaa gaattcctgc agcccgggg tccactagtt ctagagcggc cgccaccgcg 240
 gtggagctcc agcttttgtt cccttttagt aggggttaatt gcgcgcttgg cgtaatcatg 300
 gtcatactgt tt

<210> 20

<211> 219

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

gaattccagt ggaatcagtt gtaatgtctc ctttttcata tctgatttta tttagtgtct 60
 ttttttctta gatagtcttg cttaaagggtt ctcaatttat cttttcaaaa aatcttttca 120
 ttttggtgat cttttttatt attttcttca tttcattttt atttatttct gctctgatct 180
 ttattatttc ttttcttcta ataatttttg gtttagttt

<210> 21

<211> 208

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

gaattctcag taacttcctt gtgttggtgt tattcaactc acagagttga acgatccttt 60
 acacagagcg gacttgaaac actctttttg tgggaatttg aagtggagat ttcagccgcg 120
 ttgaggtcaa tggtagaaaa ggaaatatct tcgtataaaa actagacaga atgattctca 180
 gaaactcctt tgtgatgtgt gtgttcaa

<210> 22

<211> 262

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

gaattcaatg gaatggaatg gacaggaatg gaatggaatg gaaaggaatg gagggaatg 60
 gactagaatg gaatggaatg gaatgaaatc aacccgattg gaatggaatg gaatgcaatg 120
 gaatggaatg gaatcaactg gaaaggaatc aaatagaacg gaatggaata gaatggaatg 180
 gattggaatg gaatggaatg gattcaaccc gagggtgaatg gaatggaata gaatggaata 240
 aacaacgagt ggaatggaat gg

<210> 23

<211> 218

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

gaattcgttg aggagcttct ggaaagtgoa cattctgact cagcaggtat tggagtctgc 60
 atttctcatg agcactcagg tgatgaaaga gctggctcct ggacacagct ctgaatagca 120
 agggaatagc tttccttttag agaaatctgg aaaaagaacc actggagagc aatttaaaaa 180
 ataacagaat ccagggaag cttaatttct cttttatt

<210> 24

5/24

<211> 213

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

gaattcaaag gaatcatcat caaatagaac cgaatggaat cctcattgaa tggaaatgaa 60
 aggggtcatc atctaattgga atcgcatgga atcatcatca aatggaatcg aatggaatca 120
 tcatcaaattg gaatcgaatg gaatcatcat caaatggaat ctgatggaat cattgaacag 180
 aattgaatgg aatcgatcatc gaatgaattg aat

<210> 25

<211> 229

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

gaattctgtg cgtattttag aagtagaatt ataagatttg tggatatgtt agttttggag 60
 tgtgaggtca aaggcgtttt gagcaacttg taagaaacca tttttaaggc ggaagtcggg 120
 aattttgttt tttatatgtt gaatttgaaa tccttattaa acatccaagt ggagaggctg 180
 gatagacaat taaatttaga ccctgaggtt cgggaaggaa gtccaatgg

<210> 26

<211> 216

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

gaattcttca agaaacatca aggagggatg tatagatagt tttttaaaaa accgaaatgt 60
 aaaagaaata caagaagaat ggaaacatct acataacgag agtggaaaga aatgaaaata 120
 gaggtagata gattagatag atagatagat agatagattg attgatggat tgatagattg 180
 atagatatag aaataaaaga aagaaaatag aagatg

<210> 27

<211> 244

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

gaattccaat gcaatgttaa acagaaagca gccctttttt tcaaaattta taggcaaggt 60
 gtttaacata tggctaaata atgttaattt atagtaaata tccttcataa ggatgaagat 120
 gtacccttct atttttagttt gctgagtgct ttttagtcat aattgagtgat tgacatctgt 180
 caaatatttt ttctgcatct attaagacat ccatgtgata tttctctttt attctcttac 240
 tatg

<210> 28

<211> 237

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 28

gaattcaatc accatogaat acaatcgaat ggagtcacgc aatcgactca agtggaaataa 60
 tcattgaatg gaatcgaatg gaatcatcga gtggaatcga atggaatcat gatgaaatgg 120
 aatcgaatgt aatcatcatc aaatggaatc aaaaataaac atcatcaatt ggtattgaat 180
 ggaattgtca tcaaatggaa ttcctgcagc cggggggatc cactagtctt agagcgg

<210> 29

<211> 184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 29

gaattctttc cagaagggtt ttaatttact ttgctcggct ccatcagggg aatcactatg 60
 gcagctatag ccttaagaaa tttatttctt aaataagact tgagagtcag aattgcttct 120
 ttatccatgg tctcgaggat gggatgttgt gatagcaggc gtgaaaacaa cattcatctc 180
 ctgg

<210> 30

6/24

<211> 191
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 30
gaattcagaa tctggatggc aaggaagcgc atcaagatgc aggagaaagt tgaaacctaa 60
tccaaggaat acagtaaaac aatccagaag cttgaaagac aaaatagcca ttttaagaac 120
caaactgagc ttctggaagg gaaaaattta cttcaagaat ttcataatac aatcaaaagt 180
atTTTTTTTT t
<210> 31
<211> 143
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 31
Gaattccgct tggggaggga actgtcttcg tccaggaaaa tgtttttnat aagccaccca 60
tggtaaaagg agaagtcatt acggttaggg tgttggcagg aatcaaatta agaaaaggaa 120
tggtatcca tccggttgta tgt
<210> 32
<211> 169
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 32
gaattctaga ctgctgcacc tccatatacct cagcaactgg catgatgatg agcagggagt 60
tagtagaact aatacactaa tatgtaaatt aatgaatgaa tgtttcctga gtgtggcttt 120
aagtttctca gaagaagaca gttcatacac tggatgataa aattctggg
<210> 33
<211> 124
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 33
gaattctagg acaaggatgat tgcctagat tttctcttaa acgcctcctg ttagatagga 60
aatggccatt aatagagaag cttgcttgag ggagtaacct tgaaagccca ggcttgga 120
cccg
<210> 34
<211> 214
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 34
gaattctaag tttatatagg ttacaacatc acagtaagaa tgtcacagag gggatatatgc 60
ttttcatcaa acaacaaatt gaaaattttt taactcttaa ggactgattt tgcttaacta 120
caagttatgc actgatggtg gtagcttcac aaatttagaa aagttccaaa ataatgctta 180
gaaagagtag ctatttaact tctcattgaa caaa
<210> 35
<211> 164
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 35
gaattcctgt gaatgtcgtt tcaaataatta ctacgcctac gcactgacca gaacttattt 60
tttacagaat cattttgaca ggaaaagtgt ttatgatagt tttgtgttg ttgttggtgt 120
tttgtttttt catcaccag gctgcttcac atttagagct gagt
<210> 36
<211> 119
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 36

7/24

gaattctgag aactagccct ttaagactgg tggagattta ttcaggaggg aagccctgcc 60
 ccagggaataa gttgccaaga gacttgtnnt taggagatca ccagcccaaa tttccatga
 <210> 37
 <211> 208
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 37
 gaattccctt catatTTTTg gtcaaagccc agtttttctg agtcgggtggg ctaaattggga 60
 ttactctttc taatgaggca tccttggtgtg cttagaatca ctcttgactt tatcctgtcc 120
 ccctcggtgt cctaacttac caggatggag agcatttcct cattccatgt tgttgggagg 180
 ttggccact ggggtgacatc agcccagg
 <210> 38
 <211> 169
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 38
 gaattcctta acccttaatt agctttgggt tttgctcaat atcctgaagc tgggcacagt 60
 ctcaatgtaa ctattctcct aggggctgaa ctgggtgcta gtcacaaag tttggaatgt 120
 cattttagaa gcaacctcta gaagtaatcc tggtaaagccc tagaagtaa
 <210> 39
 <211> 172
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 39
 gaattcccat ctttttttgt gtgtgtgttt gagactgtat tttgcattgt cgtccacact 60
 ggagtacagt ggcgtgatct ccgctcgtg caagctccgc ctcatggatt taagcgattc 120
 tcctgcctca gcctccaag tggctgggac tacaggtgcc cgaccaacca cg
 <210> 40
 <211> 137
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 40
 gaattctgtt acttggtgat gggaaaccgt gaaggtttta agcaagactg tgatgtgctt 60
 aggtttatta gaaggttcta tgctgtcag cctccctgtc tagttctttg ctttattgac 120
 tgtntcctca ctaaatg
 <210> 41
 <211> 152
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 41
 gaattctttt ttccccagct ttatggagat ttaattgaca aataaaatgg catatattta 60
 ggtgtatata ttgatata gtatacattg tgaaacgatt actataatga agttaattaa 120
 catattcctc atcttgcata gtcaccattt tt
 <210> 42
 <211> 183
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 42
 gaattctcca tgaaaacaga catatttgat atttaggtgc tttaatggac cctgaaaaga 60
 aattagattg attcatttga agaataaatg tcgggtcccc gccctctaca tggtaaaact 120
 cttccaaatg cttctactta atggaaatgg aaattacctc tcaaaacatt acaaaaacta 180
 atg
 <210> 43
 <211> 162

8/24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 43
 gaattccgac cactgctgac cgccaggcca cacaccgggtt ttnttcagga ggtctcaact 60
 agatgctaag ctccgaagtg gaactccctc aggcactttc tgttctaatt caggaattcc 120
 tcgagcccgg gggatccact agttctagag cggccgccac cg
 <210> 44
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 44
 gaattctgtg aaataattct cagcccagac ccaaggg(a)tc cacagctcag aaatagggtta 60
 tccagaagtg ttccaaacac tagatgacag tatcccagtg ctccaaacca gcttattact 120
 tggccagaat tcctgcagcc cggggatcc actagttcta gagcggccgc caccgcggtg 180
 gagctccag
 <210> 45
 <211> 190
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 45
 gaattctctg tctgtcgatt tcagtgattt tagtgctggt cctccaattg agtactagcc 60
 ataggtcttg gcttggcact cccatcccat agccctgtgc accatagctc tgggggtgaac 120
 tcaggcaaaa cgattttcgt cccagcttg ggagcagcag gggtggggac cttggcaatg 180
 gcaatggcag
 <210> 46
 <211> 266
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 46
 gtaatacgac tcactatagg gcgaattggg taccggggccc cccctcgagg tcgacggtat 60
 cgataagctt gatatcggct tatcctgagc taggctgagc ctttgctctc ctgacctagt 120
 tagttctcat tcaaccctgt gacaagggat gtggggctca gagaacggga gggctctccc 180
 tcaggtcaca tggccagggc atggagaggc aggacttgaa tccaggtcaa tgtgacccca 240
 gagcctagtg tggaaacccg tccttt
 <210> 47
 <211> 164
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 47
 gaattctacc ctgggtagga tagtagctcc cctcaacttt acagcaaata cagctaacct 60
 tgctttacct gcgatcccgt ntttattttg ttgaattaga gaaactgagg gaagcagttc 120
 tctacactca ctttaccctt agagccctct acaatcaacc ctgt
 <210> 48
 <211> 112
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 48
 gaattcaaaag actgtnagat gtaagcagtg actganacan aggcaatgag atgagagggtg 60
 gaaaggagac caaatgtaaa agacagcaga aacttgagtg gacggtggca ca
 <210> 49
 <211> 114
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

9/24

<400> 49
 gaattctgtt ggctttacct ttaacgtgtc caaaagtgc caattatcat tncctgcnttt 60
 ngctgctact tggntcaagc cattagtatc ccttgctcca ataaactctt tcct
 <210> 50
 <211> 206
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 50
 gaattcccag taacttcctt gtgttggtg tgttcaactc acagagttga actttcattt 60
 acacagagca gatttgaaac actctttttg tggaatttgc aaatggagaa ttctgcagc 120
 ccgggggac cactagttct agagcgccg ccaccgcggt ggagctccag cttttgttcc 180
 ctttagcgag ggtaattgc gcgctt
 <210> 51
 <211> 169
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 51
 cccccctcg aggtcgacgg tatcgataag ctggatatcg gcaacttctc gctctgtcct 60
 cacatagga aagaggaagc tggtgccttc ctcttacaag agcactaatc tcacatgggt 120
 gtttacctc atgactttat ctaaacctaa ttatctttca aagaatcta
 <210> 52
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 52
 gaattcttgt ttccagtga aatttagata atttatctca ggaattcctg cagcccgggg 60
 ttccactag ttctagagcg gccgccaccg cgggtggagct ccagc-t-tg ttccctttag 120
 ttaggg-taa ttgcgcttg c
 <210> 53
 <211> 203
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 53
 gaattctata tatttcccct cttttcctga ctcttcagt acaatcctaa gaccgtgcta 60
 ataacagaag acagtaatcc ctttttttag ccaaataatt tggaagccat gattttcttt 120
 gcatatcatg aaagtgaaca tgggtgttga tattgtgggt agaagctttc aagtaaaaaa 180
 gaactgtcat tcaactgaat tgg
 <210> 54
 <211> 162
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 54
 gaattctagg ccaggcgca tggttcacac ctgtaatccc agcattttcc cggaagcca 60
 aggcaggcag atcacttgag gccaagagtt caagaccaac ctggccaaag gggtgaaatc 120
 catctctact aaaaatacaa aaattagtcg ggcgcggcgg cg
 <210> 55
 <211> 193
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 55
 gaattctatt tctaggaacg ttctcaaaca agcttaagag caaagtataa aaacgatgtt 60
 cagcatataa taatatgaaa aaattttgtc ctagacattt tatatgaaaa tgtatacttt 120
 agagcatgct tcaggaaaaa aagaaagaaa aattaatcct gggaaatggg tgacattaga 180
 tacaggcgag tgg
 <210> 56

10/24

<211> 169
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 56
 gaattctgct tttatgagaa gtcagctgaa tgctatggaa aggagtatag agagtggctt 60
 aaaagtttca ggcaagttca caccaaaact tgcattctaa cctccctgaa cctgtggtct 120
 agaagggacc tatcagcaag atgataacca aaaatgtcta gaatctgag
 <210> 57
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 57
 gaattctaga gaacaatccc tactgacttc acacacaact taagaaatgc aagtaaaggg 60
 ccgggcgcgg tggccagca cctgtaatcc cagtactttg ggagcctaga ggcaggtggt 120
 cattggaagt caggagtcca a
 <210> 58
 <211> 183
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 58
 gaattctctg atgtttagtt aggtatgacc tacagttaaa ggctttgctg cattccttac 60
 gttttagagg tttctctccg gtatgactac ttcgatgtcg agtaacggac gttgaattac 120
 gataaaaggc tttgccacat tttttgcatt tatagggttt ttctccagta tgaattccag 180
 cag
 <210> 59
 <211> 185
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 59
 gaattctatc aatgtcaatt aaatccagtt gatggatggc cataatttta aatctattta 60
 ctttttgggg tattttttta aataaaatct gtgattatct atcttttaat gaatgcctta 120
 gatcattcac attaaagtga ttgttggtgt agttgtgttc atgtatacca tacttataac 180
 tgttt
 <210> 60
 <211> 163
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 60
 gaattctact aaaacttttag aaaagaaatt aacaccaatt ctcaaactat ttcagaaaat 60
 tgaaaaggag aagcctctcc caactaattc tatgaatcca gcattacccc ttacaaaaac 120
 cagacaaaga tgaacaaaa taataagaag aaggaactct ggg
 <210> 61
 <211> 103
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 61
 attttccctg ctgggtgtgt ccagagatcc tttctggcta gtctgctagc actgcatgtg 60
 tcnaccagca tctcaacctc aactagctg caacacttgg cca
 <210> 62
 <211> 144
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 62
 cctctccaaa aagaaaatct ctgccattct atgtacactg gctgcatgaa gatgtatgtn 60
 tatgaattag cctgcatgtc tgggtccac cctgcacatg ctaacattcc tttccctccc 120

11/24

catacgagtc caaaaaaact atgc
<210> 63
<211> 173
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 63
tcagtccttca ggtgatattg aaatggaggc tgtaagggtt taataatata ggtttcaaaa 60
ccaggcagca acacatacta gccatgtaaa acttgagcta cccaacccg cctgggttgtt 120
gcttagtcct tctttgaaaa ttaaaattct gttctctgga aatagtattt agg
<210> 64
<211> 150
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 64
ttacaacctt tatgagattg gtgccattat caccattttc agacatgaaa aatacagcac 60
acacagttta agtaatatgc tgaattcctg cagcccgagg gatccactag ttctagagcg 120
gccgccaccg cgggtggagct ccagcttttg
<210> 65
<211> 159
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 65
ccagtaactt ccttgtgttg tgtacattca actcacagag ttgaacgttc ccttagacag 60
agcagatttg aaacactctt tttgtgcaat tggcaagtgg agatttcaag cgctttaagg 120
tcaatggcag aaaaggaaat atcttcgttt caaaactag
<210> 66
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 66
tcccaatcct tcctgtgact caagcntctg ctcattaggt atcctaggac aatattatgc 60
tgtntctatc aga
<210> 67
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 67
agccagagcc aagctctctc actctgcaga gaagcctcag tctttagaag acagttcagc 60
tttatccaga attcctgcag ccggggg
<210> 68
<211> 110
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 68
tatgatcaac aaatatatct tacaacatga gggtgcaata agatgagaaa ggttcgagag 60
tgtttatctt tagcaaatac atactatcgc gctcaaggta agtnttcaag
<210> 69
<211> 111
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 69
Tattgtgccc agagataatt gtccctgcagt cagagcattc tatgtntttt tctgtcgttg 60
attaatcaag aggggttcag gcttccctgt aggaaaatgt ctaaagcata a
<210> 70
<211> 138

12/24

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 70
attcatttat accctcattt attcatccaa cagccattca ataagcgtct gtgttcagcc 60
atgctctgac actgattgan ttctgcagc cgggggatcc actagttcta gagcggccgc 120
accgaggtgg acgtcagc
<210> 71
<211> 144
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 71
caggttgatg aagaaacgga tattagtgc atgaagaaca gtcctgtctc tgtcagctgg 60
tcatttttta tatgtcagag actgtcgaat ttctattgcg tttcaactaa ttacctcagt 120
ttgttaaaac tgaatatgaa ttcc
<210> 72
<211> 113
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 72
ntctatctag ttttatatga aganatcacg tatcacacga tggaccctaa gaggtccaaa 60
tatccacttg cagttctaca aaaagagtgt ttcacaacag cactatcaag agg
<210> 73
<211> 97
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 73
tacattcttt ttcttaacta tccaccacct cccctcaaaa ttttaacagc atccagcctc 60
acaaaactca gatcttccct gtgtacagtt ccacttt
<210> 62
<211> 143
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 74
gacaattcca ttcaatacca attgatgatg tttatttttg attccatttg atgatgatta 60
cattcgattc catttcatca tgattccatt cgattccact cgatgattcc attcgattcc 120
attcaatgat tattccactt gag
<210> 75
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 75
aatgataat atagtcaatt caggaaagan aatcatccta anatttcgta ttatgattag 60
aagtgttaatt tcgctganat agaaaatttc tcattatt
<210> 76
<211> 88
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 76
agctgacatt gtaatttaat aaagctaagg ataaaacttc tgggtttttt gtttattgag 60
cccgtgact agaagagata agagatgg
<210> 77
<211> 101
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 77

13/24

ctctggttgt tgtcagggtt ttnattatta gattccagaa ttcctgcagc ccgngggatc 60
cactagtctt agagcggccg ccaccgcggg ggagctccag c
<210> 78
<211> 109
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 78
aaggttacag tgagctatga tccaccactg cactccagca tgggcaacaa agcgagaccc 60
agtatttaga tttatttggt aatagccagg catattggtg catgcgtgt
<210> 79
<211> 121
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 79
ctatatcaca tactttattg tcttgtagag tttgctttgt ttcattgtgt gataccctga 60
nttctgcag ccggggggat ccactagtgc tagagcggcc gccaccgcgg tggagctcca 120
g
<210> 80
<211> 144
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 80
ctatgagtgg cctccaagga gcattagatt agaagggtgc tggagggtgg atattttcat
acacagagac aaagctcccc atcccacaac agatccagag tctgtnttgg accacaggga
aggaaggccc ttctccagga ttct
<210> 81
<211> 160
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 81
ttaggagagg tcagagtggg ctggagcagc caggtgagcc tttgttgtgt aggcaggagg 60
aagaagcagt ggattttgag ttgaggacgg aatttgagag ggggagggaa aaggaaggga 120
atccgcagag gcagagctga ctgcactcgt gagggagggg
<210> 82
<211> 164
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 82
atacaaattg cagactgcag cgttctgaga aacatctttg tgatgtttgt attcaggaca 60
gagagttgaa cattccctat catagagcag gttggaatca ctccttttgt agtatctgga 120
agtggacatt tggagcgctt tcaggcctat gttggaaaag gaaa
<210> 83
<211> 164
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 83
ttgtggttct agattttatg gtctcttttt tatttttcat tttttgagac caagtttcac 60
tcttgttgcc cggctggagt gcagtgcgc gatcttggct caccgcaacc tctgcctcca 120
ggattcaagc gattcgctg cctcagcctt actgagtagc tccc

<210> 84
<211> 141
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

14/24

<400> 84
tagttccagc tataccactt tctagccttc ttgattttgc tgaactgaga gtcagaagag 60
atatgtntct aggttatttc caatcattat gccatctcgg aagtggcagg ggtgctatac 120
tagactgaga caaatacccc a
<210> 85
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 85
cttctaaaat tctatggtag tatganaggc tacacaaaag tntttggacc tgatacaaat 60
attataaatg at
<210> 86
<211> 135
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 86
tcataaaaata accattaata tttcactttc gttttttatc ctaacctttt tctaacacat 60
aaacatatct attgggaggt cgaggcgggc ggatcacgag gtaggagatc gacgaccatc 120
cggtaaaagg tgaaa
<210> 87
<211> 107
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 87
cagccccaag aatgtctgga gcccgagtat catctggcag ccaccctcgg agaagggggg 60
gatccactag ttctagagcg gccgcaccgc ggtggagctc agctttt
<210> 88
<211> 109
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 88
ccatgtggaa gcacagctat aaggctcttt ctatgaacca gaaagcaggc tttctctaaa 60
caccgaatct gccaatgcct tgatcttgga tttcccagat tccgaacta
<210> 89
<211> 112
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 89
cagggactta atcaacgcaa gcttatgacc cgcacttact gggaattcct cgttcatggg 60
gaataattgc aatccccgat ccccatcacg aatgggggttc aacgggttac cc
<210> 90
<211> 125
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 90
acctgtaatc ccaactactc tggaggctga ggcaggagaa tggcatgaac ccgggaggtg 60
gaggatgcag tgagccaaga ttgtgccact gaactctagc ccaggcaaag gtgagagact 120
tgatc
<210> 91
<211> 130
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 91
cacttaagat tgtatctttn actctatgag ttattttctca ataaaaagta aaatnnannn 60
tactaataat taganatnat cttctctaga atgagcattn aatgagtcag ctagagaggc 120

15/24

gacttaactg
<210> 92
<211> 104
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 92
cagcccttac attgtgtctg tgacccagtg ttaaagaga cccaggtcaa gagacaactc 60
tttggctggt ctaggatatt ntataanata gatctatcac tctg
<210> 93
<211> 122
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 93
cgtcagctca gcagcctgac aatttgaact cagtagtata acattgccac atggctatgt 60
tcaggggtta atacttctta gcaaagaaat agagaccaat ctctgtgatc actttaaact 120
tt

<210> 94
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 94
cacatggatg gggaggcctt ccaatcatgg cagaaggcaa aggagaaagn nagcacatct 60
tacaggcagc aggcaa
<210> 95
<211> 109
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 95
cagccccagc atggcaggaa tatntntngc attgggttct ttggaggagg aaagtacgtn 60
ctcagagnag gcaatttntc gccgctggtt taaggctttn natgaccga
<210> 96
<211> 112
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 96
cagccccgaa ttatgtatta anagttatcc tcaccaagaa agacaagggt tctgtagttc 60
tctaacatca tatccctata tanntntnac tgtgcagtat ccagacaatg acactccttc 120
agagagaatt ctatggccac atctctaa
<210> 97
<211> 122
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 97
taaaactttg ttataagaga tggaagggtt taaatatata nntctaannn ntnntagttt 60
aaagaattcc aaacttaaac atcttcagta gacttgacat tgtatttcgn atatcctatg 120
tc

<210> 98
<211> 88
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 98
ctttaaattt ataaactcca aggcagtaca agtctggnnn nnnnnnagct acccaatatc 60
tgataaatat gaatacctaa taatagac

16/24

```

<210> 99
<211> 105
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 99
tcctaaaact ctccctcacc agcatcccaa tttaaagcct tggtccttgc tctccctct 60
agggggatcc actagttcta gagcggccgc caccgcggtg gagct
<210> 100
<211> 86
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 100
cgccactatg ctgagctact tnnntntgt tttgtagaga tgggtgtttc accatgttgc 60
ccagactgat cttanactcc tgggtc
<210> 101
<211> 156
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 101
gacctccac tgatttncca tottgaccac tgcctaccca attactgtnc cagtcgaaac 60
ctgggcgcga tgtgacgact ctctccctct ctacagctac acaaccgccg tgtgctgtcg 120
ggtcttatcc tttccacca gtccatggct tggctc
<210> 102
<211> 173
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 102
cagccccata aaattaacca tcacactagg tgatgtottt nttttttgag agcaagtctt 60
gctcgtcacc aggctggaat actgtggtgg gatctcagct cactgcacct ccacctctg 120
ggttcagca attgttctgc ctgagcctgg gggatccact agttctagag cgg
<210> 103
<211> 191
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 103
cagccccctt agaaatagct cttcgagaca ctctggtag acatgatccc aggettgtg 60
agcagctgtg caaccatgcc tcaggcctga ggaacagctc gcaggccact ctgtctggta 120
ataccccagg ccggccaagc aatagatctg catcccaggg ggatccacta gttctagagc 180
ggcggccacc g
<210> 104
<211> 191
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 104
bagccccctt ggctcagtct ggaaaggcaa gacaactaga aggtgggggg cttccagggc 60
ataggtagat tcanaaatgt actgattggc acttcottga ccgagttatt aactaaagac 120
ctggaatcaa tagaaaggaa tgtctgggtt aaggtaaggg ctatggggga tccactagtt 180
ctagacggcc g
<210> 105
<211> 103
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 105
ttctnagana tttnacatca nattaaccca ctganaaact tgcnaactct cactttcaac 60
gtctgancgg naattttaat tggnggatcc actagttcta gag

```

17/24

<210> 106
<211> 173
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 106
cagccccctt attaactcac cccttgcat tgttcaaccc tagntaataa agtcactcag 60
gtgtacttct ganaattgaa gttaaattatt tttcaccaca gagctgaacc attacagagg 120
<210> 107
<211> 111
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 107
tcataanata accattaata tnnnnntnnn nnnnnnatcc taacattttt ctaacacata 60
aacatattca ctggggaggc cgaggcgggc ggatcacgag gtcaggagat c
<210> 108
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 108
caatttacac tctggcaggc ggaganagga naatttntnc tgtnggaagg gggagttgng 60
gnaggaggcc
<210> 109
<211> 104
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 109
caaanactaa natacctctn agtctggnta gacactttca ctggataggt agaggccttt 60
nctacaggnt atnanaaggc caccacagtc atttnttccc ttct
<210> 110
<211> 68
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 110
tcatgtaggc ctnttcacga ttttnnaat catttnagtn acatccaagt nnnnntngct
gttaatca
<210> 111
<211> 107
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 111
cagccccaat caagggtgt tttcaatct ctttgtataa aannotagat tctgtattag 60
tctgttctca ggctgctaataa aaagacatac ccaaggctgc gtacttt
<210> 112
<211> 173
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 112
tggaagaaa aactatgtac atctgagacg ctgcagctgg taccctactt ctttcagagc 60
atcaacaggc taagtgtgga ttcattccaca ccctcagacc cgtgaccgta g
<210> 113
<211> 121
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 113
gaatctctac accaaccctc tcttaacctc tacagttcaa atccaaatct caaactttct 60

18/24

gatttgaatt tgcttatccc tatgtaattc taacttaaga cctaagacca aaagggaatc 120
c
<210> 114
<211> 103
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 114
tcttcagct aaatagttgc agagtcagag tagaagccag ctctcctgac aatatatttn
atgatattct agagaatatc cctagaatca ttcctaggta ctc
<210> 115
<211> 86
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 115
tgtcattggt aatttatgtg agaacacaaa gcatccaaca ntanntgatt ctgcatttcg 60
accaacagat agtttctcat cgaaga
<210> 116
<211> 120
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 116
cagccccgtt tgttttacct ttngcttttn atgtgcttct ctaacanttn agggcgaact 60
aaccagcatg aggnntgtnt ctgcttgatt ttnaaccatc ctttcctgtc tgtacacagg 120
<210> 117
<211> 95
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 117
ccctccctga gtctntntaa cagcagcaat gccccaaaac ctnanttggt tcccctgata 60
gccaggtacc cggnttctnt ngcagtgcta actgt
<210> 118
<211> 109
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 118
tattaannnn nctaatactna atatntngt ntctcgggga acagaaaagc ctgaggagaa 60
ggagagatag tnggaatntc tagtnttgg agcagtcaga acacacata
<210> 119
<211> 79
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 119
cctgtattac agaaccaagg attaaaaact cagcagatgt gtaatgagtt ttaaataatt 60
acaatatnnn nnntataaa
<210> 120
<211> 83
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 120
tagttgatcc gnnagcccat gcgataccgc gnnngcgctc gnnngccgang ggggatccac 60
tagttctaga gcggccgcca ccg
<210> 121
<211> 177
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

19/24

<400> 121
 cgtttggtttt accttttcaact tttaaatgtgc tttctctaac aattaagggc gaactaacca 60
 gcatgaggat tgtgtctgct tgatttttaaa ccacccctta atgtctgtac acaggaaatg 120
 ttatcaacaa gagatgattc ttgggggatc cactagggtc tagagcggcc gccaccg
 <210> 122
 <211> 103
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 122
 ttatagttaa anacanagat ggtaacagcc ctttcccaaa gcagacctcc ttcttgccctg 60
 gnaaagggct gttaccatct ttgttttaaa ctataaacta taa
 <210> 123
 <211> 139
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 123
 caagaagggt ggtgctggca ttttcttctg gtgagggcct caggaagctt tcaatcatgg 60
 cagaaagtga gaggagagta ggcattgtac anagagagac atgccttcat tctcggggga 120
 tccactagtt ctagagcgg
 <210> 124
 <211> 103
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 124
 cattaaagcc tttnttagga aatctnttta aacaacagaa taaaagggtat gacttttnaga 60
 tagaactttt ngtgacatct ccagtttctg gttacatgat att
 <210> 125
 <211> 103
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 125
 cagagagaga gaaacanaca gncagagaga gagagaccac anagagagag agagagagaa 60
 gatcagacag agaaaganag agacagagac agacannnag aca
 <210> 126
 <211> 113
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 126
 cagccccaga gagagagaaa cagacaggna gagagagaga gacacagaga gagagagaga 60
 gagaagatca gacagagaaa gagagagaca gagacagaca nanagaatag aga
 <210> 127
 <211> 181
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 127
 actcatttta tgaggccaga atcatcctga taccaaaacc tggcagagac acacacacac 60
 aaaagaaaat ttcaggccaa tatccctgat aaacattgat gcaaaaatcc tcaataaaat 120
 actggcaaac tgaatccagt agcacatcaa aaagctgggg gatccactag ttctagagcg 180
 g
 <210> 128
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 128

20/24

cccgcccat gtagctctca ggtggcccat gacaccacac tgttcttcct tcctctccat 60
 gggtcacacc ggccacctag tcagtcctaa cgtcggaaacc tggatacctc cattgctggt 120
 gctggaccg tcactgtttt ggatattttc

<210> 129

<211> 173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 129

tcctaagtgt cccaacagtg gagcacatta ttcaggaact taaagatata atcgcagaac 60
 agcaoctcca agctcgtaaa tgcttatctc ggtaaccctc agtcatggga caatcaaatt 120
 caatacatcg gaggaacacc atgctgacgg gggatccact agttctagag cgg

<210> 130

<211> 187

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 130

ctatagaagc tccttctata ttngccttat nncactcatg gcggtagtft gaattcagat 60
 ctctgggtca tttattatcc atggaaagtt aatttgagat gttggaactt ttaaacagtg 120
 tttgtttatt gtgctaataca cgatctgtta ctaaatttga ttgggggatc cactagttct 180
 agagcgg

<210> 131

<211> 170

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 131

cagatatttg tagatatgcc gcgttatttc tgagggctct gttctgttcc attgatctat 60
 atctctgtct ttggtaccag taccatgctg ttttggttac tgtagccttg tagtatagtt 120
 tgaagtcagg tagcatgatg cctccggggg atccactagt tctagagcgg

<210> 132

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 132

tctctaaaat tctatggtag ttgaaaggct acacaaaagt ttttggacct gatacaaata 60
 ttataaatnn nnnnnnnnt gtntgatttg atactccatg taaaactctt cctaattggc 120
 tcgggggatc cactagttct agagcgg

<210> 133

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 133

tattaaaaat acaaaaaatt agccgggagt ggtggcacgc gcctgtagtc ccagctactc 60
 gggaggctat ggcaggaaaa tcccttgaac ctgggaggcg gaagttgcag cgagaagaga 120
 tca

<210> 134

<211> 164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 134

ctgtctttca agtttcaggc ttgaaagtga aaaataatgc ataatttacg gaagctattg 60
 gtgtgaaaat atccaagaga agaagtagga atagtggagt gaaataaaca ggagattagg 120
 tagatagaaa ttgactattg ggggatccac tagttctaga gcgg

<210> 135

21/24

<211> 193

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 135

cttaatatgg tatgcttaat gtagtgagct aaacaaaaata acaatgtgta tagtattgtn 60
 taanataccc cacttccaat tgttttaaagt gcaaaacaaa ttatatgttt ganagttaaag 120
 gtggaataaa tgaagattaa atgatatgaa ctactcagaa aacaggtagg gggatccact 180
 agttctagag cgg

<210> 136

<211> 233

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 136

cattgattaa atttattgat gcattgtaaa tttgaatcaa tatctattaa tcccaagctg 60
 gagtgcagtg gcgccatctc agctcactgc gacctctgcc tcccgggttc aagcaattct 120
 catacctcag cctcccgagt agctggaacc acaggcatga gccaccatgc ccggctagtt 180
 acagggtttt cctatgctat ccaggctgga gtgcagtgagg ggatccacta gtt

<210> 137

<211> 194

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 137

ctaaaggatc cttcaactct gtgagttgaa tacacacaac acaaggaagt tactgagaat 60
 tattctgtct agcataatat gaagaaatcc cgtttccaac tgaagacctc aaagaggctg 120
 aatatccact tgcagacttt acagagtgtt tcctaactgc tctatgagag ggggatccac 180
 tagttctaga gcgg

<210> 138

<211> 155

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 138

cagcccggaa aatatagggc aaatTTTTTT attttgctgt ttggtgactc caccactttt 60
 gcaacagtac ttttggtgcc cattaaccaa attactttga tttctttgtg taaatattat 120
 gaagaccaga accTTTTGag ggggatccac tagtt

<210> 139

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 139

ctagacaaaa gcccatcac ctggatgaat cagtgcagag ttacgtcaca aagtcctttt 60
 aggcagatcc tagacaaggg ttacatcaact tggatgatca gtgcagagat atgtcacaaat 120
 gccactgtag ggtgagccta gaaaagagtt tcatgacctc ggtgatcagt gcagaggggg 180
 atccactagt tctagagcgg

<210> 140

<211> 169

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 140

ctgtgactgt gcctatagaa gaaaaaaaaa atagcgtgta atctcagcac tctgggagggc 60
 caaagcaggg gggatcactt gagggcaaga gttcaagacc agcctggcca acaaagcgaa 120
 accttctctc tactaaaaat acaaaaatta gccgggcatg gtggcactc

<210> 141

<211> 211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

22/24

```

<400> 141
agggccacca gctggtgaat cctgccccac cagctcagag ctcttcccat tcatggagta 60
tatcatagga gactggattt ccaaagctgc atggagcttc attcctgaac tggtcaccct 120
gtgtcttagtc ttgttttctc aatccatcct gctctccagc agcctcaata cttctaaaaa 180
tgtccggggg atccactagt tctagaggcg g
<210> 142
<211> 195
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 142
cacagacatc ctgtgccacc tcattcactc tcacatgcct ctgaggtgag ggggataaca 60
gcactagtat catttgatac tgatacaaat cggctctaaa tattgtgggg atgctggtgg 120
tgttattgct ggactccatt acacaagttt catgagccag tgaaaatcac tgtgggggat 180
ccactagttc tagag
<210> 143
<211> 199
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 143
Cagccctaaa gtataataaa aaaaaatttt ttaaagaatc ttcacaaaag aactctgaaa 60
tgtcagcatg agcagatgat gaagtatcat aggaatccat ttttgctgt atttcttatt 120
taatagagaa agaaatttca tatgctgtaa tatgtttcca attggaaatt aaaatctgat 180
aggggggatc cactagttc
<210> 144
<211> 178
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 144
cagccccctt gtaacaatat gggctgttct agctgtaatt cacctctgga gccatcagaa 60
tcctcctggt aaaaatggcc ctaatatcaa acacagaggc cactgctagt taaactttat 120
aaatcgaaca agaaatcata tgatataatc agataagagc ctgggggatc cactagtt
<210> 145
<211> 158
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 145
cagccccctg ggctcaagca atctgcccac ctgggcctcc ccaagtgtg ggattacagg 60
tgtgagtnac tgncccggc cagcctgtgc tatttgtcag aaacagggag ttggggcaac 120
cctggtgcc aagatatggg gggatccact agttctag
<210> 146
<211> 184
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 146
cagcccctgc taaataactt tcgaagttaa gaaagctaatt ggtatatcat caggcaccaa 60
taaaactatc ttgagatttg acaatgccaa ctgaaaaatt tcttctgcaa ggcagagcca 120
gttacctttt ataatatcaa tttagattca cacaaagaca ttctcagggg gatccactag 180
ttct
<210> 147
<211> 219
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 147
cagccccacg ggtggtaatc ntggctgctt tntgcacttc cacataaagt gcttctncta 60
cgctgtctcc actcagaaac aattacaaca gtatgtgaag cagtattgaa aacttcnnaa 120

```

23/24

gctgcacaca gattcattga aaagggcaga agcctcatta atactagagt ctgaggcaca 180
acctatgacc gaacactggg ggggatccac tagttctag

<210> 148

<211> 185

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 148

cagccccag aaaaaaaga gcaagaggat ggggctgaaa aaattactca aagaaataat 60
ggctaaaaag tactcagggtt tatcaaaaga caagtctgca gaactaagaa gatgacaaaa 120
tccttgtcat agacagaatg tgtgtttccc aaacttcgtg tgttgggggg atccactagt 180
tctag

<210> 149

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 149

cagccctgca gtatttagtt ttctattcct gagttagttc acttaggaaa atgggtctcta 60
gtcccatcca tgaagcacca aatccctcca gcccagtagc aaggagacag aatttttact 120
ctgtctctg

<210> 150

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 150

cagccccctct tttctgctcc taaggaagat gcattctcag gatacaggan nnnngggggga 60
tccactagtt catg

<210> 151

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 151

cagccccatt taacctggag aggaataccc taaggattct tggaggctga aagacttaaa 60
atttgaggaa tgaaagaata gcaagggtga atcgg

<210> 152

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 152

cagccctgca gtatttagtt ttctattcct gagttagttc acttaggaaa atgggtctcta 60
gtcccatcca tgaagcacca aatccctcca gcccagtagc aaggagacag aatttttact 120
ctgtctctga tgagaagagt gtac

<210> 153

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 153

cagccctgat agttacctta ctgttttgct atgaccatac tctacataga gtatttagat 60
taaattggagg aatgagaata tgagattagt ttctcatatt cttgtgatca tgacaggacc 120
tgagattctg cacagatg

<210> 154

<211> 139

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

24/24

<400> 154

cagccccgct gtttctaaag tcagtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgagag 60
agagagagag agagagagcg tatgcatgtg tgtctgcatg tgtgtgtgcg cgcgtacatt 120
tgaggagacgg tgtgtaagt

<210> 155

<211> 133

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 155

cagccccggaa aggtaataca agtaagatga ttataaaca atgcttttaa acagagtcaa 60
tgaaaccagt ctgtttgtga ggccaaggc tccatatattt acaactcagt ctgtaaggat 120
agctatgtat ctg

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2003/000304

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 38/43,31/7088,39/395, A61M 1/36, G01N 33/68, A61P 35/00,31/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 38/43,31/7088,39/395, A61M 1/36, A61B 5/145, A61P 35/00,31/00, G01N 33/569,33/68 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RU 2207876 C1 (TKACHENKO VITALY VASILIEVICH) 10.07.2003, page 4, paragraphs 3-4, page 5, paragraphs 2,4,5, page 6, paragraphs 1,2,4, page 8, paragraphs 7-8, pages 9,17, paragraph 1 at the bottom, page 22, example 17	1-10,12,13,19,20
Y		14-18
X	US 6521409 (THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION) 18.02.2003, page 16, paragraphs 4,6, page 17, paragraphs 1,7,9, page 18, paragraphs 1-3,13, page 25, paragraphs 6-10, page 26, paragraph 1, page 32, paragraphs 2-3, page 33, paragraph 2	1-10,11,19,21
Y		22
Y	FAVOROV PETR VLADIMIROVICH, Issledovanie kinetiki prevraschany DNK pod deystviem DNK-topoizomeraz I DNK-abzimov, Avtoreferat dissertatsii na soiskanie uchenoi stepeni kandidata biologicheskikh nauk, M., 1999, pages 3-4	16
Y	NIKOLENKO GALINA NIKOLAEVNA, Sozдание rekombinantnykh antitel protiv virusa kleshevoogo entsefalita I izuchenie ikh svoystv, Avtoreferat dissertatsii na soiskanie uchenoi stepeni kandidata biologicheskikh nauk, Koltsovo, 1999, pages 1-2, 19	17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 March 2004 (19.03.2004)		Date of mailing of the international search report 25 March 2004 (25.03.2004)
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YASEROVA NATALIYA EVGENIEVNA, Razrabotka I izuchenie diagnosticheskikh vozmozhnostei immunofermentnykh test-sistem na osnove antigennykh preparatov zolotistogo stafilokokka I DNK , Avtoreferat dissertatsii na soiskanie uchenoi stepeni kandidata meditsinskikh nauk, M., 1988, pages 17-18	22
Y	US 6428785 (IMMUNOLYTICS INC.) 06.08.2002, the abstract, pages 10,14, paragraphs 7-13, page, 15, paragraphs 1-5, page 30, paragraphs 3-4	14,15,18
A	KRAPF F. et al., The estimation of circulating immune complexes, C3d, and anti-ds-DNA-antibody serum levels in the monitoring of therapeutic plasmapheresis in a patient with systemic lupus erythematosus. A case report, Clin Exp Rheumatol. 1985 Apr-Jun; 3(2):159-62, abstr. PubMed, the abstract	1-10,19,20
A	RAZ E. et al., Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney, J Immunol. 1989 May 1; 142(9):3076-82, abstr. PubMed, the abstract	1-10,19,20
A	US 5889153 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.) 30.03.1999	14,15,18

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2003/000304

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: A61K 38/43,31/7088,39/395, A61M 1/36, G01N 33/68, A61P 35/00,31/00 Согласно международной патентной классификации (МПК-7)		
В. ОБЛАСТИ ПОИСКА: Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7: A61K 38/43,31/7088,39/395, A61M 1/36, A61B 5/145, A61P 35/00,31/00, G01N 33/569,33/68		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:		
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):		
С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	RU 2207876 C1 (ТКАЧЕНКО ВИТАЛИЙ ВАСИЛЬЕВИЧ) 10.07.2003, с.4, абзацы 3-4, с.5, абзацы 2,4,5, с.6, абзацы 1,2,4, с.8, абзацы 7-8, с.9,17, абзац 1 снизу, с.22, пример 17	1-10,12,13,19,20
Y		14-18
X	US 6521409 (THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION) 18.02.2003, с.16, абзацы 4,6, с.17, абзацы 1,7,9, с.18, абзацы 1-3,13, с.25, абзацы 6-10, с.26, абзац 1, с.32, абзацы 2-3, с.33, абзац 2	1-10,11,19,21
Y		22
Y	ФАВОРОВ ПЕТР ВЛАДИМИРОВИЧ, Исследование кинетики превращений ДНК под действием ДНК-топоизомераз и ДНК-абзимов, Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, М., 1999, с. 3-4	16
Y	НИКОЛЕНКО ГАЛИНА НИКОЛАЕВНА, Создание рекомбинантных антител против вируса клещевого энцефалита и изучение их свойств, Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Кольцово, 1999, с. 1-2,19	17
X последующие документы указаны в продолжении графы С.		
* Особые категории ссылочных документов: А документ, определяющий общий уровень техники Е более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее О документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д. Р документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета и т.д. Т более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения Х документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень Y документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории & документ, являющийся патентом-аналогом		
Дата действительного завершения международного поиска: 19 марта 2004 (19.03.2004)		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 25 марта 2004 (25.03.2004)
Наименование и адрес Международного поискового органа Федеральный институт промышленной собственности РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Березжковская наб., 30.1 Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		Уполномоченное лицо: И. Каткова Телефон № 240-25-91

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(июль 1998)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2003/000304

С. (продолжение) ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	ЯСРЕБОВА НАТАЛЬЯ ЕВГЕНЬЕВНА, Разработка и изучение диагностических возможностей иммуноферментных тест-систем на основе антигенных препаратов золотистого стафилококка и ДНК, Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, М., 1988, с. 17-18	22
Y	US 6428785 (IMMUNOLYTICS INC.) 06.08.2002, реферат, с.10,14, абзацы 7-13, с.15, абзацы 1-5, с.30, абзацы 3-4	14,15,18
A	KRAPF F. et al., The estimation of circulating immune complexes, C3d, and anti-ds-DNA-antibody serum levels in the monitoring of therapeutic plasmapheresis in a patient with systemic lupus erythematosus. A case report, Clin Exp Rheumatol. 1985 Apr-Jun; 3(2):159-62, abstr. PubMed, реферат	1-10,19,20
A	RAZ E. et al., Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney, J Immunol. 1989 May 1; 142(9):3076-82, abstr. PubMed, реферат	1-10,19,20
A	US 5889153 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.) 30.03.1999	14,15,18